

**CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ DE LA TOMATIDINE ET DE SES
DÉRIVÉS SUR L'ATP SYNTHÉTASE**

par

Charles Isabelle

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Juillet 2018

Le 6 juillet 2018

le jury a accepté le mémoire de Monsieur Charles Isabelle
dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur François Malouin
Directeur de recherche
Département de biologie

Kamal Bouarab
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Vincent Burrus
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Il a été démontré dans le laboratoire du professeur François Malouin (Biologie, Université de Sherbrooke) que la tomatidine, un alcaloïde stéroïdien provenant de la famille des Solanacées, possédait une activité antibactérienne contre les *small colony variants* (SCV) de l'ordre des *Bacillales*, dont *Staphylococcus aureus*. Grâce à la collaboration du professeur Éric Marsault (Pharmacologie, Université de Sherbrooke), il a été possible de synthétiser un dérivé de la tomatidine, FC04-100, qui en plus de posséder une activité antibactérienne contre les SCV, ciblait les souches prototypes. Par la suite, des mutants ont été isolés par pression sélective, puis séquencés. Le séquençage a révélé une mutation dans deux gènes, soit une dans le gène *ccpA* (*catabolite carbon protein A*) qui conférait un niveau de résistance intermédiaire à la tomatidine et une mutation dans le gène *atpE* (sous-unité c de l'ATP synthétase) qui est associé à un haut niveau de résistance. Les mutants sélectionnés avec FC04-100 ne possédaient pas une mutation dans le gène *ccpA* et leur niveau de résistance était limité. Afin de confirmer que la cible ultime était bien l'ATP synthétase, j'ai développé un essai d'inhibition de la production de l'ATP en utilisant des vésicules de membranes inversées pour valider la cible de façon biochimique. Ce test démontre qu'effectivement, la tomatidine et son analogue FC04-100 inhibent la production de l'ATP synthétase chez *S. aureus*. J'ai aussi démontré que la tomatidine et FC04-100 n'était plus en mesure d'inhiber la production de l'ATP chez les mutants résistants, ce qui confirme que l'ATP synthétase est bien la cible de nos composés. En utilisant des mitochondries de cellules humaines pulmonaires, j'ai de plus démontré que nos molécules inhibitrices étaient beaucoup plus sélectives pour l'ATP synthétase bactérienne que mitochondriale. Ultérieurement, grâce à l'équipe du professeur Marsault et la modélisation moléculaire, il a été possible de trouver une molécule analogue à la tomatidine sans pour autant avoir un squelette stéroïdien. Par les tests d'inhibition et biochimiques, j'ai alors démontré que cette molécule possède les mêmes caractéristiques que la tomatidine ou FC04-100 envers *S. aureus* et son ATP synthétase. Il sera donc intéressant de poursuivre

avec des dérivés de cette nouvelle molécule afin de l'optimiser et éventuellement, d'obtenir une molécule pouvant être utilisée en clinique pour combattre les infections à *S. aureus* et les *Bacillales* en général.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, SCV, tomatidine, ATP synthétase.

REMERCIEMENTS

Pour commencer, j'aimerais remercier mon directeur de recherche François Malouin pour toutes les opportunités qu'il m'a offertes durant mes stages et ma maîtrise. Je suis très reconnaissant du travail et de la confiance qu'il m'a accordée durant ces années dans son laboratoire. Je garde de bons souvenirs de nos conversations ainsi que nos parties de squash, malgré le fait que je n'ai jamais réussi à lui soutirer une victoire. De plus, il m'a offert la chance de présenter mes travaux à un congrès international (ECCMID) en Autriche, une expérience très enrichissante et je suis extrêmement reconnaissant de cette opportunité de sa part.

J'aimerais aussi remercier mes conseillers professeur Kamal Bouarab et professeur Vincent Burrus pour leur temps, leurs judicieux conseils ainsi que leur support lors de ma maîtrise. J'aimerais aussi remercier l'équipe d'Éric Marsault pour leur aide et leur collaboration au projet.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire de François Malouin que j'ai eu le plaisir de côtoyer. Je vous remercie de votre support technique et moral que vous m'avez offert durant toutes ses années dans le laboratoire.

Finalement, j'aimerais remercier l'Université de Sherbrooke pour leur programme de maîtrise et le Centre d'Étude et de la Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM) pour son environnement propice aux interactions entre laboratoires.

TABLES DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1. Introduction du pathogène et importance clinique	1
1.1.2. Phénotype «small colony variants»	3
1.1.3. La chaîne de transport d'électrons bactérienne en général	7
1.1.4. Les inhibiteurs de la chaîne de transports d'électrons	19
1.2. La tomatidine et ses dérivés	29
1.3 Le projet de maîtrise, hypothèse et objectifs	31
CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	33
2.1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	36
2.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE	37
2.2.1. ABSTRACT	38
2.2.2. INTRODUCTION	39
2.2.3. RESULTS	42
2.2.4. DISCUSSION	60
2.2.5 MATERIALS and METHODS.....	64
2.2.6 FUNDING INFORMATION	73
2.2.7. ACKNOWLEDGEMENTS	73
2.2.8 REFERENCES	73
2.2.9 SUPPLEMENTAL MATERIAL	84

CHAPITRE 3 : OBTENTION D'UN ANALOGUE NON-STÉROÏDIEN DE LA TOMATIDINE.....	86
3.1. Concentration minimale inhibitrice.....	86
3.1.1. Méthode.....	86
3.1.2. Résultats.....	87
3.2. Inhibition de l'ATP synthétase	88
3.2.1. Méthode.....	88
3.2.2. Résultats.....	88
3.3. Synergie avec aminoglycosides	91
3.3.1. Méthode.....	91
3.3.2. Résultats.....	91
CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE.....	93
4.1. Preuve biochimique.....	93
4.2. Nouvelles molécules non stéroïdiennes	95
4.3 Conclusions et perspectives.....	97
BIBLIOGRAPHIE	98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

FK: Fibrose kystique

CFTR: «cystic fibrosis transmembrane conductance regulator»

SCV: « small-colony variants »

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

ccpA : « catabolite carbon protein A »

SXT: Trimethoprim-sulphaméthoxazole

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide réduite

MQ : Ménaquinones

MQH₂ : Ménaquinoles

ATP : Adénosine triphosphate

ADP : Adénosine diphosphate

FPM : Force proton motrice

$\Delta\mu\text{H}$: Gradient électrochimique

$\Delta\psi$: Potentiel membranaire

ROS : « reactive oxygen species »

CMI : Concentration minimale inhibitrice

TO : Tomatidine

FcM : FC-majeur, stéréo-isomère majeur de FC04-100

Fcm : FC-mineur, stéréo-isomère mineur de FC04-100

Gen : Gentamicine

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Tableau 1.	Susceptibility profile of the studied <i>S. aureus</i> strains and TO-resistant mutants selected after serial passage in presence of TO or FC04-100.....	43
Tableau 2.	Susceptibility profile of genetically manipulated <i>S. aureus</i> and <i>B. subtilis</i> strains.....	51
Tableau 3.	MIC ($\mu\text{g/mL}$) and inhibition of ATP synthesis (IC_{50} in $\mu\text{g/mL}$) by TO, TO analogs and reference compounds for different bacterial strains and mitochondria.....	58
Tableau 4.	MIC ($\mu\text{g/mL}$) and selective inhibition of ATP synthesis (IC_{50} in $\mu\text{g/mL}$) by TO and TO analogs for different TO-resistant mutants.....	60

CHAPITRE 3 : OBTENTION D'UN ANALOGUE NON-STÉROÏDIEN DE LA TOMATIDINE

Tableau 1.	Synergie de 20555348 avec les aminoglycosides contre la souche prototype <i>S. aureus</i> Newbould.....	92
------------	---	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.	Différences entre les phénotypes SCV et prototypes de <i>S. aureus</i>	4
Figure 2.	Modèle hypothétique des voies énergétiques et métaboliques qui sont associées au phénotype SCV.....	6
Figure 3.	Modèle de la chaîne de transport chez les bactéries.....	9
Figure 4.	Modèle proposé des oxydases terminales dans la chaîne de transport de <i>S. aureus</i>	11
Figure 5.	Modèle de l'ATP synthétase. À droite, une ATP synthétase bactérienne et à gauche, une ATP synthétase mitochondriale. Le modèle bactérien de l'ATP synthétase est basé sur celui de <i>Mycobacterium</i>	14
Figure 6.	L'hypothèse d'alternance de position et de liaison au site catalytique suite à la rotation de la sous-unité γ	16
Figure 7.	Structure du cyanure.....	20
Figure 8.	Structure de l'oligomycine A.....	21
Figure 9.	Structure de la citréoviridine.....	22

Figure 10.	Structure du : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide , DCCD.....	23
Figure 11.	Les modèles de l'inhibition de F ₀ F ₁ par le DCCD.....	24
Figure 12.	Stabilisation de la forme chargée négativement du DNP avec un proton.....	25
Figure 13.	La structure du CCCP (<i>carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone</i>).....	27
Figure 14.	Structure de la bédazoline.....	28
Figure 15.	Structures de la tomatidine (A) et du dérivé FC04-100 (B)....	31

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 1.	Structures of TO and analogs used in this study.....	41
Figure 2.	Amino acid sequence alignments of the ATP synthase subunit C for selected species.....	48
Figure 3.	Monomeric and multimeric models of ATP synthase subunit C built, respectively, on homology with templates of PDB accession numbers 1WU0 and 3ZO6, using the SWISS-MODEL server.....	53

Figure 4.	Effect of TO and analogs on the ATP synthase activity of <i>S. aureus</i>	56
Figure S1.	Amino acid sequence alignments of the catabolite control protein A (<i>ccpA</i>) for <i>S. aureus</i> SCV resistant mutants selected after serial passage in presence of TO or FC04-100 compared to the parental SCV Newbould Δ <i>hemB</i>	84
Figure S2.	Amino acid sequence alignments of the ATP synthase subunit C for <i>S. aureus</i> SCV resistant mutants selected after serial passage in the presence of TO or FC04-100 compared to the parental SCV Newbould Δ <i>hemB</i>	84

CHAPITRE 3 : OBTENTION D'UN ANALOGUE NON-STÉROÏDIEN DE LA TOMATIDINE

Figure 1.	Structure et modèle pharmacophorique de la tomatidine.....	86
Figure 2.	Effet des composés in silico sur l'activité de l'ATP synthétase de <i>S. aureus</i> Newbould Δ <i>hemB</i>	89
Figure 3.	Effet de 20555348 sur l'activité de l'ATP synthétase des mitochondries.....	90

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Staphylococcus aureus

1.1.1. Introduction du pathogène et importance clinique

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positif anaérobie facultative. C'est un microorganisme opportuniste, pouvant infecter différents hôtes, différents organes ou sites d'infection et ayant la capacité de causer autant des infections aiguës que chroniques. Les poumons des patients atteints de la fibrose kystique (FK) sont très souvent colonisés par du *S. aureus* ceux-ci étant un endroit propice à la colonisation bactérienne. La FK est une maladie génétique affectant les épithéliums glandulaires de plusieurs organes. Il s'agit de la maladie génétique létale à transmission autosomique récessive la plus commune dans la population caucasienne (Farrell, 2008). Cette pathologie est liée à des mutations dans le gène codant pour la protéine CFTR « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » sur le chromosome 7, ce qui altère la protéine CFTR. Cette protéine est un canal ionique perméable au chlore dont la fonction est de réguler le transport du chlore à travers les membranes cellulaires. Ce mouvement de chlore entraîne un mouvement d'eau et permet d'hydrater la surface bronchique. À l'aide des cils qui tapissent les bronches, le mucus peut être évacué, éliminant ainsi les bactéries et la poussière vers le système digestif. Par contre, un mauvais fonctionnement des canaux CFTR entraîne une déshydratation du liquide de surface dans les bronches, ce qui va entraîner une augmentation de la viscosité du mucus, rendant beaucoup difficile l'évacuation de celui-ci par les cils. Ces modifications au mucus des bronches vont entraîner l'obstruction chronique des

bronches, en plus de favoriser l'apparition d'infections en fournissant un milieu immobile et riche aux bactéries (Morelli *et al.*, 2015; Paganin *et al.*, 2015).

Il a été démontré que durant la première décennie de vie des patients atteints de FK, *S. aureus* est le pathogène le plus fréquemment retrouvé au niveau des poumons (Paganin *et al.*, 2015). Par contre, lors de la deuxième et troisième décennie, *Pseudomonas aeruginosa* prend le dessus sur la population microbienne (Baldan *et al.*, 2014). Il a aussi été constaté que fréquemment, *S. aureus* et *P. aeruginosa* coinfestaient dans l'infection des patients, ce qui modifiait grandement la pathogenèse de la maladie. De plus, lorsqu'il y a co-infection de ces deux espèces bactériennes, *S. aureus* est souvent retrouvé sous la forme SCV (Besier *et al.*, 2007; Sriramulu, 2013; Baldan *et al.*, 2014). Il est donc important de trouver une façon de traiter ces pathogènes et ainsi alléger le fardeau bactérien pulmonaire des patients, puisque celui-ci est associé à une diminution de la qualité de vie des patients (Paganin *et al.*, 2015).

En plus des pathogènes polyvalents, la résistance aux antibiotiques est maintenant devenue un problème majeur en clinique humaine, vétérinaire ainsi que dans le domaine de l'agroalimentaire. (Padoa *et al.*, 1999) Effectivement, depuis les dernières décennies, les bactéries ne cessent de développer de nouveaux mécanismes pour contrer les antibiotiques (Davies and Davies, 2010; Giedraitienė *et al.*, 2011; Neill, 2014). *S. aureus* est un pathogène fréquemment réfractaire aux traitements d'antibiotiques notamment via l'acquisition du gène *mecA* (*penicillin-binding protein 2a*), lui conférant de la résistance aux antibiotiques β -lactames. *S. aureus* ainsi que *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) sont des pathogènes retrouvés en communautés ou en milieu hospitalier qui peuvent être difficile à traiter et font partie de la liste des bactéries qui posent une menace et qui requièrent une attention immédiate, selon le *Center of Disease Control* (CDC) (Centers for Disease Control and Prevention., 2013). En plus d'être résistants aux β -lactames, les SARM sont souvent résistants à de nombreuses autres classes d'antibiotiques comme les macrolides, les aminoglycosides et les fluoroquinolones (García-Fernández *et al.*, 2017).

1.1.2. Phénotype «small colony variants»

Décrites pour la première fois en 1910, les bactéries ayant le phénotype SCV ont par la suite été retrouvées dans un large spectre de genre et d'espèce comme *Staphylococcus aureus* (Jensen, 1956), SARM (Bulger, 1967), *Pseudomonas aeruginosa* (Bryan and Kwan, 1981), *Burkholderia cepacia* (Häussler *et al.*, 2003) et *Escherichia coli* (Colwell, 1946) pour en nommer qu'une minorité. La majorité des études publiées dans les dernières décennies portaient sur les SCV de *S. aureus*, car ils sont souvent associés à des infections difficiles à traiter et persistantes (Proctor *et al.*, 2006). Ils sont souvent retrouvés lors d'infections chroniques chez les patients atteints de FK ou comme infection persistante telle l'ostéomyélite, l'arthrite septique et les infections des prothèses orthopédiques (Proctor *et al.*, 2006; von Eiff, Peters and Becker, 2006; Kahl, Becker and Löffler, 2016). Les caractéristiques les plus fréquemment retrouvées chez les SCV sont une croissance lente, une absence de production de pigment, une augmentation de la production de biofilm, une augmentation de l'internalisation pour *S. aureus* ainsi qu'une absence de production d'hémolysine (**Figure 1**) (Proctor *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2011, 2012).

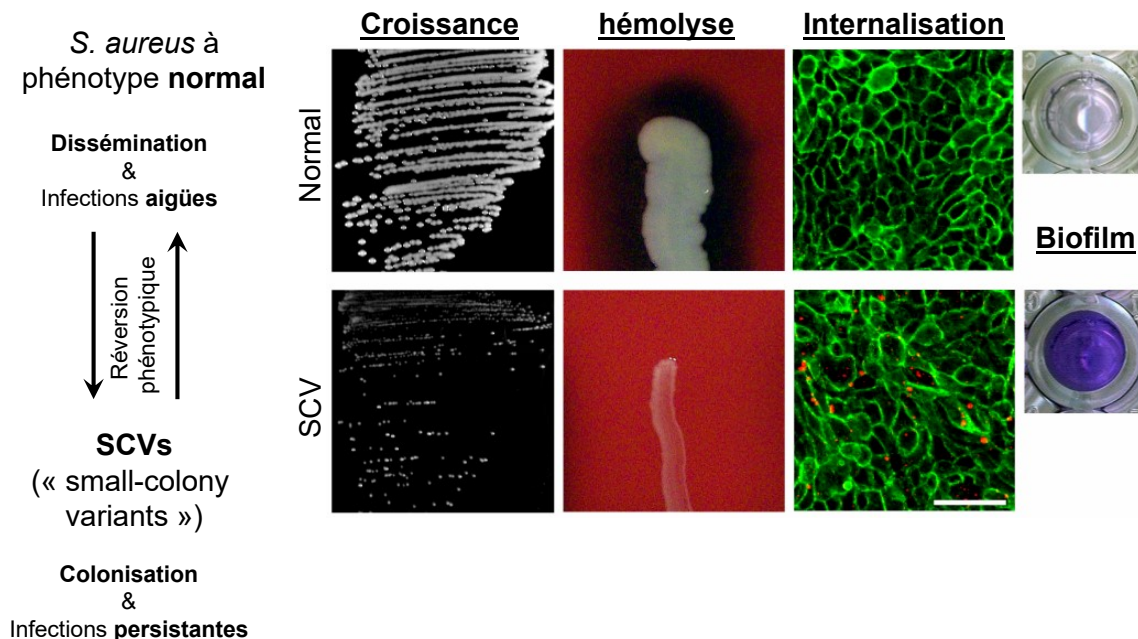


Figure modifiée de (Mitchell *et al.*, 2011, 2012)

Figure 1. Différences entre les phénotypes SCV et prototypes de *S. aureus*.

Malgré le fait qu'il existe plusieurs altérations du métabolisme bactérien qui provoquent un ralentissement de la croissance, seulement une fraction d'entre elles va causer le phénotype SCV. Parmi les SCV cliniques, deux groupes sont constamment retrouvés, les SCV ayant une déficience au niveau de la chaîne de transport d'électrons et les SCV qui possèdent une déficience au niveau de la biosynthèse de la thymidine (**Figure 2**). La déficience au niveau de leur chaîne de transport d'électrons provient d'une défectuosité dans la biosynthèse de l'hémine ou de la ménadione. Cette auxotrophie peut facilement être complémentée en ajoutant de l'hémine ou de la ménadione, ce qui va renverser le phénotype SCV. Comme il est possible de voir dans la **Figure 2**, les caractéristiques telles que le taux de croissance, la susceptibilité aux aminoglycosides, la pigmentation ainsi que la production de toxine peuvent toutes être liées au transport des électrons. Effectivement, un défaut dans la chaîne de transport d'électrons va diminuer la quantité d'ATP utilisée pour la synthèse de la paroi cellulaire, ce qui va mener à une croissance plus lente ainsi qu'à des colonies plus petites. De plus, une

défectuosité dans la chaîne de transport des électrons va réduire le potentiel membranaire de la bactérie ($\Delta\Psi$), ce qui va avoir pour effet de diminuer l'entrée des composés cationiques et par le fait même, de diminuer la susceptibilité aux aminoglycosides (Miller *et al.*, 1980; Balwit *et al.*, 1994; Proctor *et al.*, 2006; Kahl, 2014).

Plusieurs mutations peuvent produire des SCV ayant des déficiences au niveau du transport d'électrons, les plus courantes étant : des mutations dans *menD*, *hemB* et *ctaA* (von Eiff *et al.*, 1997; Clements *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2003). Ces gènes codent respectivement pour la synthèse de la ménadione (utilisée pour la biosynthèse des ménaquinones), la synthèse de l'hème (utilisé pour la biosynthèse des cytochromes) et pour l'hème A (utilisé aussi pour la biosynthèse des cytochromes). De plus, l'étude de SCV stable de laboratoire, comme les souches contenant la délétion du gène *hemB*, ont permis d'identifier plusieurs autres caractéristiques de ce phénotype. Par exemple, le système « accessory gene regulator » (*agr*) ainsi que l'expression du cycle tricarboxylique sont réprimés chez les SCV de *S. aureus*. À l'inverse, les gènes sous le contrôle du régulateur SigB sont davantage exprimés. De plus, il a été démontré que ce régulateur joue un rôle important chez les SCV (Moisan *et al.*, 2006; Seggewiss *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2008, 2013; Mitchell, Brouillette, *et al.*, 2010; Kahl, 2014; Kriegeskorte *et al.*, 2014).

Dans le cas des SCV ayant une déficiences dans la biosynthèse de la thymidine, le mécanisme n'est pas aussi clair que dans le cas des SCV avec une chaîne de transport d'électrons altérée. Généralement, ces SCV possèdent une mutation dans *thyA*, qui code pour la thymidylate synthétase. Les SCV-thymidine ont tendance à émerger après de longs traitements avec les antibiotiques triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT). Le SXT ne cible pas la synthèse de la thymidylate, par contre, il cible la biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique et cet acide agit comme coenzyme pour la thymidylate synthétase (Gilligan *et al.*, 1987; Stryer, 1995; Chatterjee *et al.*, 2008).

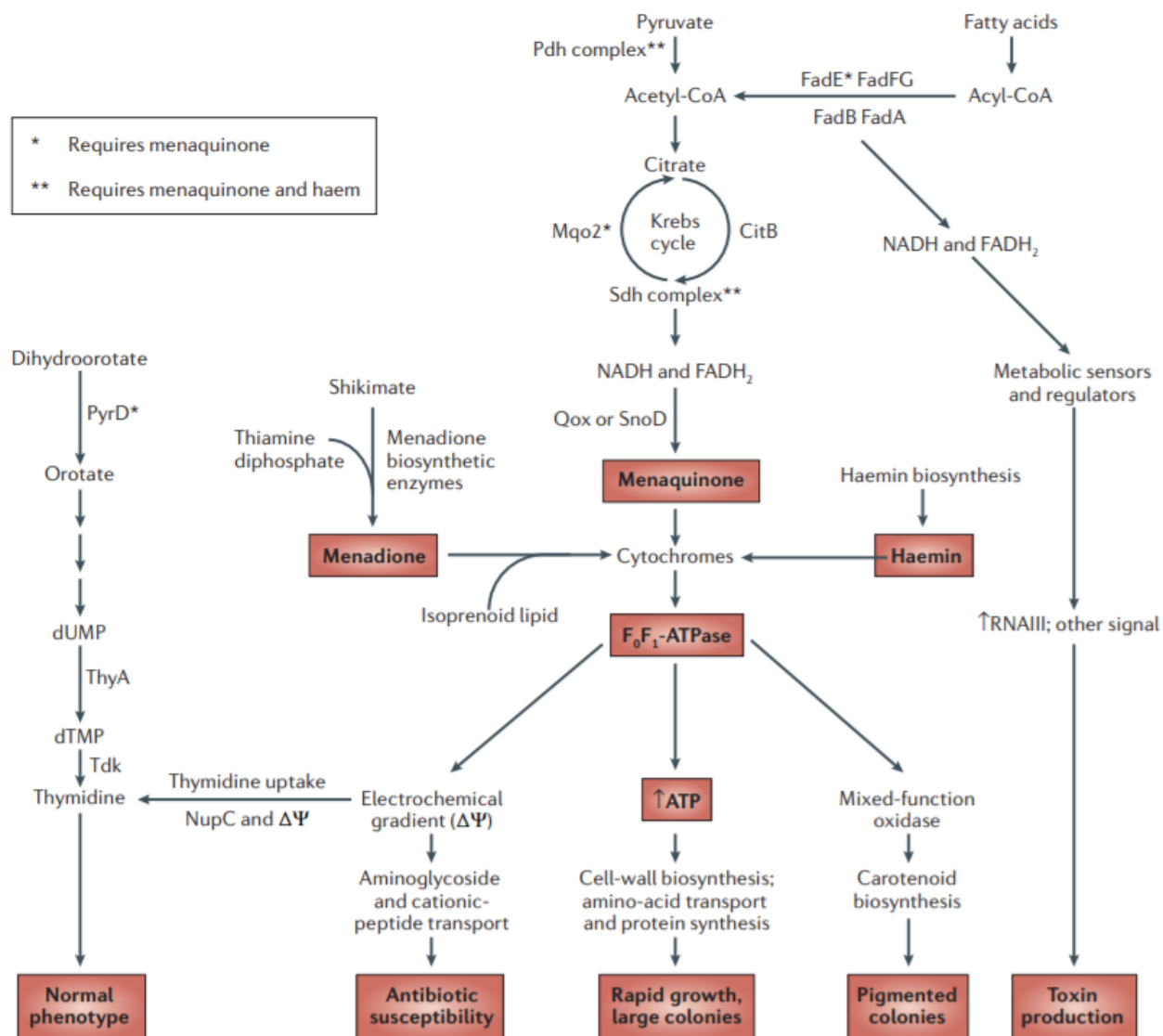


Figure tirée de (Proctor *et al.*, 2006)

Figure 2. Modèle hypothétique des voies énergétiques et métaboliques qui sont associées au phénotype SCV.

CitB, aconitase; FadA, β-ketothiolase; FadB, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; FadE, electron-transport flavoprotein; FadFG, acyl-CoA dehydrogenase; Mqo2, malate: quinone oxydoréductase; NupC, nucleoside-uptake protein; Pdh, pyruvate dehydrogenase; PyrD, dihydroorotate dehydrogenase; Qox, quinol oxidase (aerobic);

Sdh, succinate dehydrogenase; SnoD, staphylococcal Nuo orthologue (microaerophilic NADH oxidase); Tdk, thymidylate kinase; ThyA, thymidylate synthase.

1.1.3. La chaîne de transport d'électrons bactérienne en général

Malgré le fait qu'il existe une grande diversité de composantes dans les chaînes respiratoires bactériennes, il est possible d'émettre un modèle de base les généralisant. De façon générale, les chaînes respiratoires bactériennes sont composées de 3 constituants : les déshydrogénases primaires, les quinones ainsi que les oxydoréductases terminales. Dans le cas des déshydrogénases, elles sont chargées d'oxyder les substrats tels les coenzymes NADH et FADH₂ ainsi que de « pomper » des protons du côté externe des membranes bactériennes. Les quinones servent d'intermédiaires entre les déshydrogénases primaires et les oxydases terminales. Ces petites molécules liposolubles non protéiques permettent le transport d'électrons entre les composantes de la chaîne de transport d'électrons. Il existe deux catégories de quinones : les benzoquinones, qui contiennent les ubiquinones, ainsi que les naphthoquinones, qui contiennent les ménaquinones. Les bactéries à Gram négatif possèdent les deux catégories de quinones, tandis que les bactéries à Gram positif ne possèdent que les ménaquinones (Schägger, 2002; Voggu *et al.*, 2006).

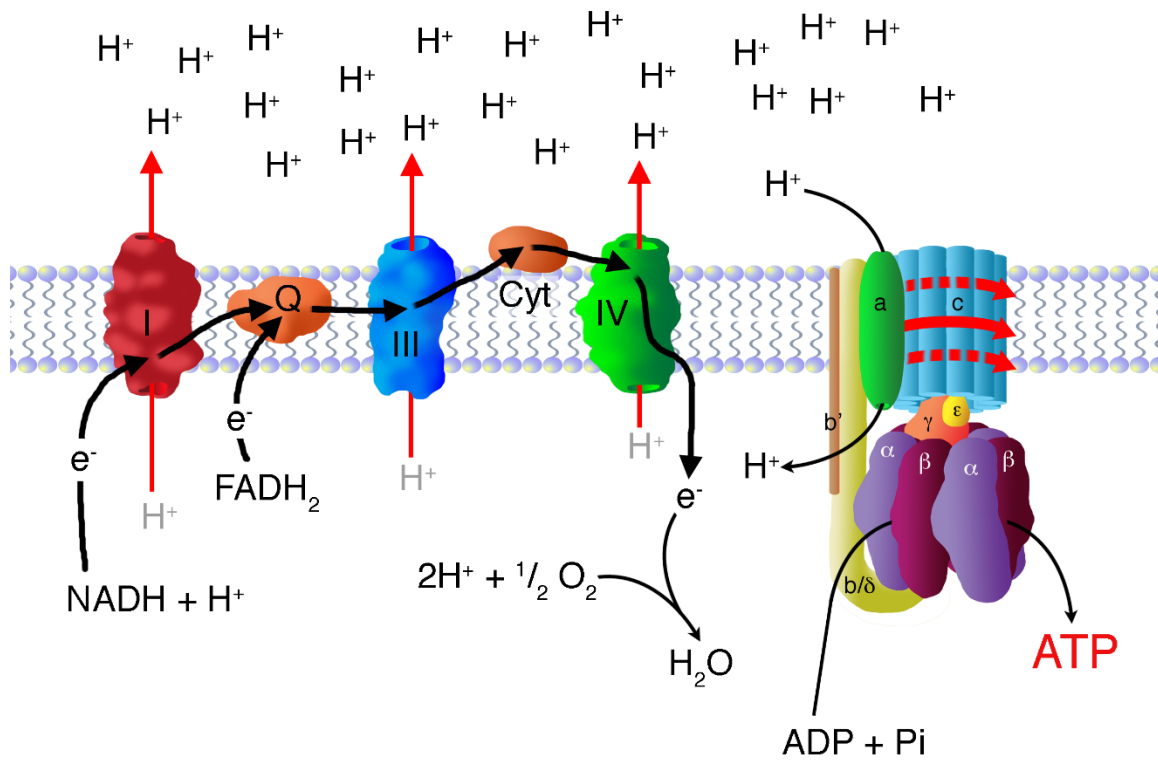
Plus précisément, la chaîne de transport est composée principalement de 4 complexes protéiques (**Figure 3**) :

Le complexe I. Il s'agit d'une NADH déshydrogénase qui catalyse la réduction d'une ménaquinone par le NADH. L'énergie de cette catalyse permettra de pomper 4 protons du côté extracellulaire de la bactérie.

Le complexe II. Il s'agit majoritairement d'un succinate déshydrogénase qui va venir oxyder le succinate en fumarate afin de former du FADH_2 , qui va ensuite fournir les électrons nécessaires à la réduction de la ménaquinone.

Le complexe III. Il est formé de 3 composantes, le cytochrome b, le cytochrome c ainsi que la protéine Rieske. Souvent appelé complexe bc_1 , il transfère les électrons des ménaquinones réduites au cytochrome c, qui va ensuite les transférer au complexe IV, le cytochrome c oxydase.

Le complexe IV. Le cytochrome c oxydase catalyse la réduction de l'accepteur final d'électrons en une molécule réduite tel le H_2O , nitrite, CO ou hydrogène. Le choix des molécules oxydées et réduites dépendra si les conditions sont aérobiques, anaérobique ainsi que de l'espèce bactérienne.



(Dessin réalisé par Benoît Leblanc, Université de Sherbrooke)

Figure 3. Modèle de la chaîne de transport chez les bactéries

1.1.3.1. La chaîne de transport d'électrons de *S. aureus*

Contrairement à celui d'*Escherichia coli*, le système de transport d'électrons des staphylocoques n'est pas encore très bien caractérisé. Jusqu'à présent, nous savons que les staphylocoques possèdent seulement des ménaquinones comme isoprénoïdes quinoléique. Les deux ménaquinones principales possèdent sept ou huit unités d'isoprènes et jouent un rôle très important dans le transport des électrons et dans la phosphorylation oxydative (Collins and Jones, 1981; Götz and Mayer, 2013). Les électrons du cycle des ménaquinones sont transférés à l'oxydase terminale qui va réduire l'oxygène en H₂O (Götz, Bannerman and Schleifer, 2006). Selon la littérature, il n'est pas encore clair si *Staphylococcus aureus* possède deux ou trois branches respiratoires (Clements *et al.*, 1999; Götz and Mayer, 2013). Les études sur les cytochromes des staphylocoques suggèrent que ces bactéries possèdent au moins deux ou trois oxydases terminales alternatives et dépendantes des ménaquinols : un cytochrome *bo*, un cytochrome *aa*₃ et un cytochrome *bd* oxydase (**Figure 4**). Généralement, le cytochrome *aa*₃ est une pompe à protons (Thöny-Meyer, 1997), mais il a été suggéré que chez *S. aureus* seulement le cytochrome *bo* oxydase et non le cytochrome *aa*₃ pompe des protons (Tynecka *et al.*, 1999).

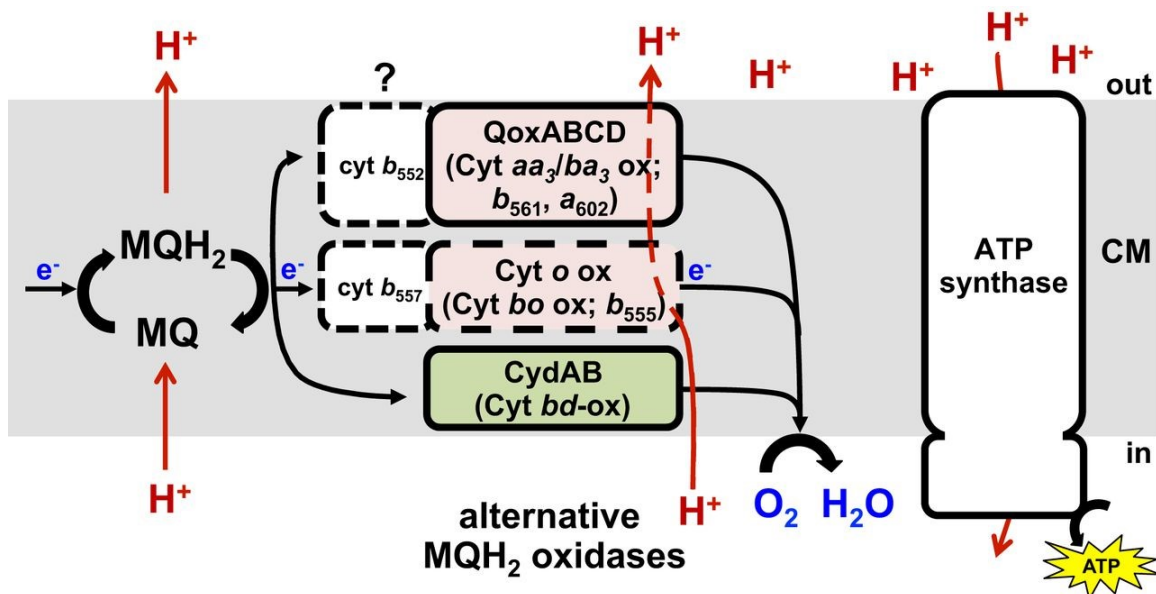


Figure tirée de (Götz and Mayer, 2013)

Figure 4. Modèle proposé des oxydases terminales dans la chaîne de transport de *S. aureus*.

Dans la **Figure 4**, il est possible de constater que les ménaquinones (MQ) sont réduites en ménaquinols (MQH₂). Les MQH₂ vont alors transférer leurs électrons aux oxydases terminales, qui elles, vont réduire l'O₂ en H₂O. Le cytochrome aa₃ oxydase, codé par l'opéron QoxABCD, est composé des cytochromes a-602 et b-561 et représente l'oxydase terminale principale (Voggu *et al.*, 2006; Götz and Mayer, 2013; Hammer *et al.*, 2013). Il est suggéré que le cytochrome bd oxydase, codé par l'opéron CydAB, fonctionne lors de conditions microaérophiles et ne serait pas en mesure de pomper des protons (en vert). Finalement, le cytochrome bo oxydase est constitué des cytochromes b-555 et b-557. Les cytochromes en rose, donc les cytochromes aa₃ oxydase et bo oxydase, sont suspectés pour fonctionner en conditions aérobiques et pour être en mesure de pomper des protons.

La dernière étape de la respiration aérobique, la réduction de l'O₂ en H₂O, est médiée par les oxydases terminales qui sont dépendantes de l'hème. Les bactéries utilisent souvent plusieurs oxydases terminales afin de supporter leur respiration aérobique. Dans ce cas, on dira que la chaîne respiratoire est branchée (voir **Figure 4**, l'électron du ménaquinone a le choix de plusieurs cytochromes). Cette caractéristique permet aux bactéries de s'adapter rapidement à leur environnement (Tynecka *et al.*, 1999; Poole and Cook, 2000; Voggu *et al.*, 2006; Borisov *et al.*, 2011).

Dans une étude récente de (Hammer *et al.*, 2013), il a été démontré que lors de conditions aérobiques, il y aurait probablement juste deux oxydases terminales présentes chez *S. aureus* et elles se complémenteraient. Un double mutant pour les gènes codants pour les cytochromes *aa₃* et *bo*, présentait un phénotype SCV similaire aux mutants $\Delta menB$ et $\Delta hemB$. Ces dernières mutations empêchent la biosynthèse des ménaquinones et de hème, respectivement, et causent une inhibition complète de la respiration aérobique (Hammer *et al.*, 2013). De plus, le potentiel membranaire était très réduit chez le double mutant, soit une caractéristique similaire aux mutants *hemB*. L'étude finit par conclure que les cytochromes *aa₃* et *bo* sont les seules oxydases terminales utilisées pour générer un potentiel membranaire et faciliter la respiration aérobique (Götz and Mayer, 2013; Hammer *et al.*, 2013).

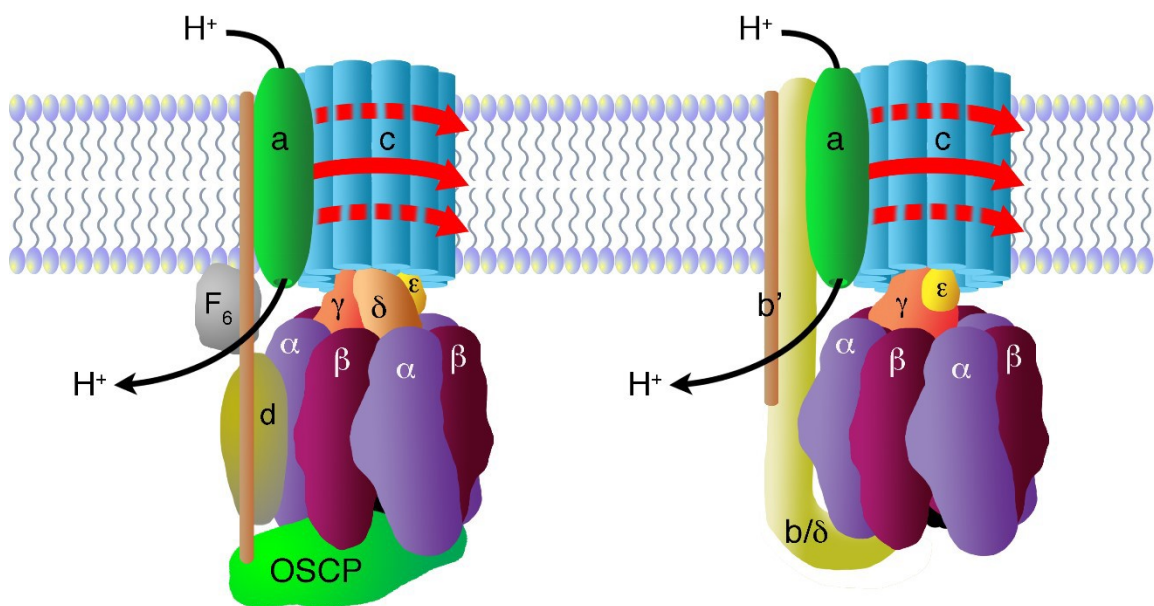
1.1.3.2. L'ATP synthétase, structure et fonction

1.1.3.3 Généralité de l'ATP synthétase

L'adénosine triphosphate (ATP) est la source la plus prévalente d'énergie chez les cellules. L'énergie libérée lors de l'hydrolyse du lien anhydride phosphorique terminal permet aux cellules de réaliser des réactions qui requièrent de l'énergie, comme le transport membranaire ou le métabolisme (von Ballmoos, Cook and Dimroth, 2008). Le complexe de l'ATP synthétase (aussi appelé F₀F₁ et F-ATPase) est retrouvé autant

chez les bactéries, les mitochondries et les chloroplastes (Boyer, 1997; Walker, 2013). Comme son nom l'indique, il s'agit de l'enzyme responsable de la synthèse de l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (P_i). Les mitochondries et les bactéries aérobiques emploient une série de complexes dans la chaîne de transport d'électrons qui va pomper des protons vers l'extérieur dans le but de charger la membrane pour la synthèse de l'ATP dans un processus nommé la phosphorylation oxydative (von Ballmoos, Cook and Dimroth, 2008; von Ballmoos, Wiedenmann and Dimroth, 2009). Le fait de charger la membrane va créer un gradient électrochimique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, puis les protons à l'extérieur de la cellule vont décharger la membrane en pénétrant la cellule. Ce mouvement de protons au travers de la membrane va générer de l'énergie que l'on nomme force proton motrice (FPM) (Mitchell, 1961). Dans le cas des bactéries anaérobiques, certaines vont plutôt utiliser l'énergie générée par une réaction de décarboxylation pour instaurer un gradient électrochimique avec l'ion Na^+ et cette différence de potentiel, comme dans le cas des protons, va générer l'énergie nécessaire pour que réaction de synthèse de l'ATP se produise. Ce processus se nomme la décarboxylation oxydative (Dimroth and von Ballmoos, 2007).

Dans le cas de l'ATP synthétase bactérienne, celle-ci est composée d'une région soluble F_1 à l'intérieur de la bactérie et d'une partie ancrée à la membrane, la région F_0 . Plus précisément, la région F_0 est composée des sous-unités $a_1b_2c_n$ (le nombre de sous unités c formant l'anneau est variable selon l'espèce (Fillingame, Angevine and Dmitriev, 2003)) et la région F_1 est constituée des sous-unités $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (Abrahams *et al.*, 1994) (**Figure 5**).



(Dessin réalisé par Benoît Leblanc de l'Université de Sherbrooke.)

Figure 5. Modèle de l'ATP synthétase. À droite, une ATP synthétase bactérienne et à gauche, une ATP synthétase mitochondriale. Le modèle bactérien de l'ATP synthétase est basé sur celui de *Mycobacterium*

L'opéron est organisé sous la forme *atpIBEFHAGDC* où *atpHAGDC* code respectivement pour les sous-unités δ , α , γ , β ainsi que ϵ du domaine F_1 et où *atpBEF* code respectivement pour les sous-unités a, c ainsi que b du domaine F_0 (Walker, 2013). Le gène *atpI* coderait pour une protéine inconnue non essentielle, du moins chez *E. coli* (von Meyenburg *et al.*, 1982). Cet enzyme utilise l'énergie électrochimique que crée le déplacement des protons vers l'extérieur de la membrane, la FPM (Mitchell, 1961). Ce mouvement de protons de l'extérieur de la membrane vers l'intérieur entraîne une rotation du moteur F_0 qui permet la synthèse de l'ATP dans la région F_1 (Diez *et al.*, 2004).

1.1.3.3.1. Structure de la région F_1

La région F_1 consiste en un assemblage hexamérique des sous-unités α et β , positionné en alternance autour des sous-unités γ et ϵ qui forme une tige centrale. Les sites catalytiques de liaison des nucléotides se trouvent sur chacune des trois sous-unités β , à la jonction entre la sous-unité α et β . L'asymétrie de la région F_1 est due aux différentes interactions que la sous-unité β peut avoir avec la sous-unité γ . Effectivement, lorsque la sous-unité γ tourne, les trois sous-unités b vont adopter 3 conformations différentes. Les différentes conformations de la sous-unité b sont directement corrélées avec l'affinité de liaison aux nucléotides. Ainsi, lors d'une rotation, une sous-unité b va passer séquentiellement d'une conformation dite «open», «tight» et finalement à «loose» (**Figure 6**) (Capaldi and Aggeler, 2002).

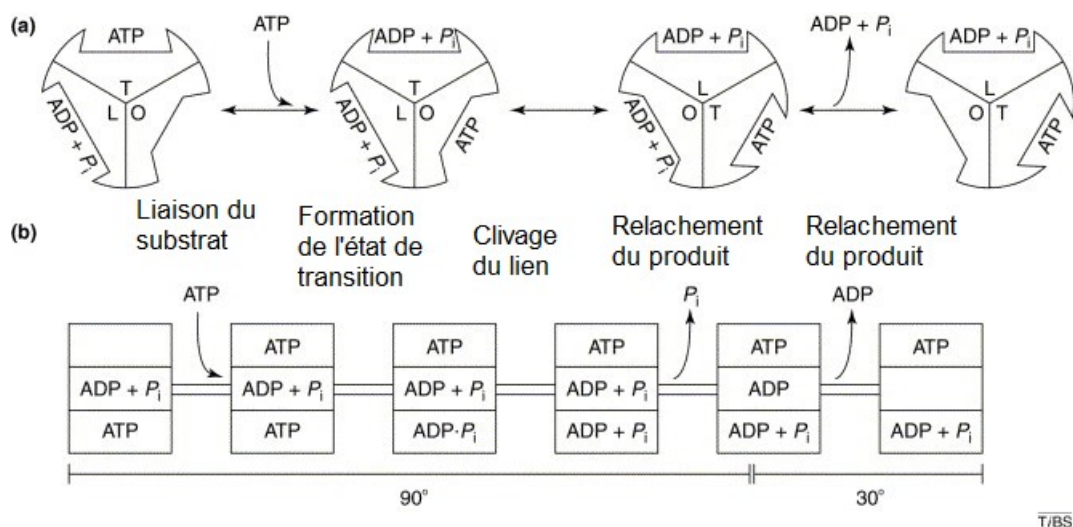


Figure modifiée de (Capaldi and Aggeler, 2002)

Figure 6. L'hypothèse d'alternance de position et de liaison au site catalytique suite à la rotation de la sous-unité γ .

Ici, il s'agit d'un exemple d'activité ATPase de l'enzyme ATP synthétase. A) Chaque site catalytique va passer par les 3 conformations, soit « open » (O), « tight » (T) et « loose » (L). L'ATP va venir se lier au site O ce qui va le convertir en site T « tight » et occupé par de l'ATP. Après le clivage du lien phosphorique, le site T est converti en site L « loose » et occupé par de l'ADP + P_i . Dans cette conformation, les produits sont libres de s'échapper de la sous-unité. Le processus inverse se produit lors de la production de l'ATP (Nadanaciva, Weber and Senior, 2000; Menz, Walker and Leslie, 2001; Yasuda *et al.*, 2001; Capaldi and Aggeler, 2002).

1.1.3.3.2. Régulation de la région F_1

L'activité de l'ATP synthétase est une excellente façon pour les cellules de générer un $\Delta\mu H$, un gradient électrochimique, principalement une FPM. Par contre, cet enzyme

peut aussi dépléter le pool d'ATP de la cellule dans des conditions pauvre en oxygène, car l'enzyme va hydrolyser l'ATP dans le but de rétablir le $\Delta\mu\text{H}$ (Fischer, Gräber and Turina, 2000). Chez les bactéries aérobiques, le principal problème est de bloquer l'hydrolyse de l'ATP par l'enzyme lorsque l'oxygène est limité et que le $\Delta\mu\text{H}$ diminue. Il existe de nombreux mécanismes d'inhibition impliquant du Mg-ADP et une modification de la sous-unité ϵ (Kato-Yamada *et al.*, 1999; Feniouk, Suzuki and Yoshida, 2006). En absence d'ATP, les deux hélices α situées en C-terminal de la sous-unité ϵ vont s'allonger et devenir plus flexibles. La sous-unité ϵ pourrait alors bloquer la rotation horaire (sens de l'hydrolyse de l'ATP) de la sous-unité γ sans pour autant bloquer la rotation antihoraire (sens de la synthèse de l'ATP) (Duncan *et al.*, 1995; Kato-Yamada *et al.*, 1999).

1.1.3.3.3. Structure de la région F_0

La région F_0 dans l'ATP synthase est la partie qui est ancrée dans la membrane. Comme mentionné plus haut, elle est composée d'un anneau oligomérique de sous-unité c qui est jouté latéralement par les sous-unités a et b_2 (Mellwig and Böttcher, 2003). Chaque sous-unité c consiste en deux hélices α qui sont reliées par une boucle hydrophile du côté du cytoplasme de la membrane. Dans l'anneau formé par les sous-unités c (que j'appellerai anneau c dorénavant), la région formée par l'ensemble des boucles hydrophiles forme une zone de contact avec la tige centrale du rotor, les sous-unités γ et ϵ (Stock, Leslie and Walker, 1999; Capaldi and Aggeler, 2002). La sous-unité a est une protéine hydrophobe composée entre 5 et 6 hélices transmembranaires. La translocation des ions à la jonction entre les sous-unités a et c, est responsable de l'énergie de couple qui est appliquée à la sous-unité γ , ce qui permet la synthèse de l'ATP par la région catalytique F_1 . La sous-unité b est composée d'une hélice α en N terminal qui traverse la membrane ainsi qu'une partie à l'extérieur de la membrane qui est collée sur la tige périphérique (Revington *et al.*, 1999). La sous-unité δ forme un

complexe très fort entre la sous-unité a et la sous-unité b. De plus, cette sous-unité forme la tige périphérique qui touche à la fois à la région F_0 et à la région F_1 .

1.1.3.3.1 Anneau c

Le nombre de sous-unités c qui composent la partie rotative de la partie F_0 , l'anneau c, varie entre 10 et 15 selon les espèces. Malgré le fait que les causes de cette variabilité ne soient pas vraiment connues, ces différences ont des conséquences importantes sur l'ATP synthétase. En effet, le nombre de sous-unités c formant l'anneau c est égal au nombre d'ions transportés au travers de la membrane lors de chaque cycle de l'ATP synthétase. Puisque l'on sait que l'ATP synthétase possède trois sites catalytiques et donc, produit 3 molécules d'ATP par cycle, il est possible de calculer le nombre d'ions qui traversent la membrane par molécule d'ATP produite. Effectivement, le nombre d'ions qui traversent la membrane par molécules d'ATP est égal au nombre de sous-unités c composant l'anneau c divisé par 3. Cela veut dire qu'une espèce qui possède un anneau c comportant 15 sous-unités c devra fournir seulement deux tiers de la force ion motrice d'une espèce qui possède 10 sous-unités c dans son anneau c (Jiang *et al.*, 2001; Fillingame, Angevine and Dmitriev, 2003; Mitome *et al.*, 2004; von Ballmoos, Cook and Dimroth, 2008). La majorité des bactéries aérobiques possède un anneau c de 10 sous unité. Ces organismes maintiennent une FPM élevée, principalement grâce au potentiel membranaire ($\Delta\psi$) généré par les complexes de leur chaîne de transport d'électrons (Stock, Leslie and Walker, 1999; Jiang *et al.*, 2001).

1.1.4. Les inhibiteurs de la chaîne de transports d'électrons

Il s'agit de substances qui sont en mesure de se lier à certaines composantes de la chaîne de transport d'électrons, bloquant ainsi sa capacité d'oxyder les composés réduits. Cette inhibition va causer une accumulation de composés réduits avant le complexe inhibé et une accumulation de molécules oxydées à la suite du complexe inhibé. Étant donné qu'il n'y aura pas de transfert d'énergie de cette réaction vers le reste de la chaîne, il y aura un arrêt de fonctionnement de l'ATP synthase ou du complexe en question. Afin d'aller plus en détail, je passerai en revue quelques inhibiteurs différents complexes de la chaîne de transport d'électrons.

1.1.4.1. Cyanure

Une des molécules les plus célèbres des films d'espion est en effet un inhibiteur du cytochrome c oxydase. Effectivement, le cyanure (**Figure 7**) est en mesure de lier à cet enzyme, empêchant ainsi celle-ci d'effectuer le transfert d'électrons vers l'accepteur final. Dans des conditions aérobiques, cela voudrait dire que la bactérie ne pourrait plus utiliser l'O₂ et cela entraînerait un arrêt complet de la chaîne de transport d'électrons (Antonini *et al.*, 1971; Leavesley *et al.*, 2008). Par contre, la liaison entre le cyanure et le cytochrome c oxydase est complexe et dépendante du niveau d'oxydation du cytochrome. Effectivement, dans des conditions normales, le cytochrome c oxydase va réduire O₂ en H₂O au centre binucléaire hème a₃-Cu_B (Nicholls and Soulimane, 2004). Cette réaction sert normalement à produire un gradient de protons et ainsi générer un $\Delta\psi$. Ce centre binucléaire peut exister sous trois formes : réduit, oxydé et partiellement réduit. Lorsque le centre du cytochrome est complètement réduit avec son ion ferreux Fe²⁺ et son ion cuivre Cu⁺, il peut alors lier l'oxygène et le complexe IV va transférer les électrons du cytochrome c à une molécule d'oxygène. En revanche, le cyanure, lui, est en mesure de lier le cytochrome dans ses trois états d'oxydation,

même s'il possède tout de même une plus grande affinité pour la forme complètement oxydée du cytochrome. En liant ainsi le centre binucléaire du cytochrome c oxydase, il empêche l'oxygène de s'y lier et inhibe ainsi la chaîne de transport d'électrons et du même coup, la production d'ATP (Antonini *et al.*, 1971; Jones *et al.*, 1984; Nicholls and Soulimane, 2004; Leavesley *et al.*, 2008).



Figure modifiée de Wikipédia
(https://en.wikipedia.org/wiki/Ammonium_cyanide)

Figure 7. Structure du cyanure

1.1.4.2. Oligomycine

L'oligomycine (**Figure 8**) est aussi en mesure de lier l'ATP synthase, mais seulement chez les mitochondries. Effectivement, bien que le site responsable de la liaison soit conservé chez les levures et les humains, il est très variable chez les bactéries (Symersky *et al.*, 2012). Plus précisément, le mode d'action de l'oligomycine est de découpler la partie F₀ et F₁ du complexe de l'ATP synthétase. Ces régions sont très importantes pour le transfert du proton de la membrane interne de la mitochondrie à l'espace intermembranaire. Durant ce mécanisme d'action, l'oligomycine va venir former un complexe avec la protéine OSCP (Oligomycin-sensitivity-conferring protein), une protéine localisée entre les parties F₀ et F₁. Le complexe oligomycine-OSCP va alors induire une suppression de l'action phosphorylante de la partie F₁, inhibant ainsi la production d'ATP (Symersky *et al.*, 2012).

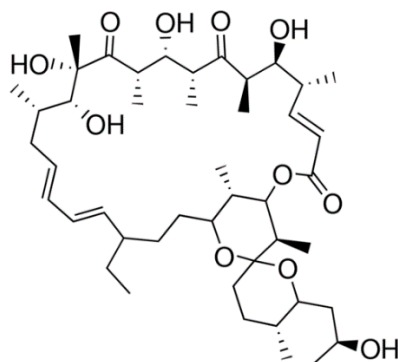


Figure tirée de Wikipédia
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Oligomycin>)

Figure 8. La structure de l'oligomycine A.

1.1.4.3. Citréoviridine

La citréoviridine (**Figure 9**) est une molécule produite par les genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Ce composé inhiberait l'activité ATPase de la région F₁ des mitochondries ainsi que des bactéries (diminution moins marquée). La citréoviridine agit comme un inhibiteur non compétitif de l'ATP synthase (Satre, Bof and Vignais, 1980; Gause, Buck and Douglas, 1981; Hong and Pedersen, 2008). Plus précisément, ce composé aurait un mécanisme d'action similaire à l'aurovertine (Linnett *et al.*, 1978), c'est-à-dire qu'il lierait la sous-unité β du domaine F₁ de l'ATP synthase et ainsi inhiberait la synthèse d'ATP et favoriserait sa catalyse (Johnson *et al.*, 2009). En liant la région F₁ du complexe de l'ATP synthétase, la citréoviridine va venir changer la conformation du complexe, altérant ainsi sa capacité à lier à l'ADP (Satre, Bof and Vignais, 1980) .

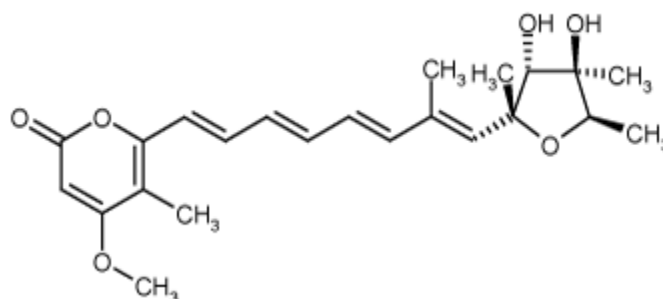


Figure tirée de (Hong and Pedersen, 2008)

Figure 9. Structure de la citréoviridine

1.1.4.4. DCCD

Il existe aussi des molécules qui sont capables de lier directement l'ATP synthase et ainsi arrêter la production d'ATP chez les bactéries. L'une de celles-ci est le N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide, DCCD (**Figure 10**). Ce composé est utilisé comme inhibiteur standard des régions F_0 et F_1 depuis les années 1960. Le DCCD réagit spécifiquement avec le résidu carboxylé « H^+ -binding» de la sous-unité en formant de l'urée N-acyles stables (Sebald, Machleidt and Wachter, 1980). Cette modification covalente va venir bloquer la réaction de couplage de F_0F_1 . De plus, il a été rapporté que l'incorporation d'une seule molécule de DCCD par région F_0 était suffisante pour inhiber l'activité de l'ATP synthétase (Hermolin and Fillingame, 1989). Le cristal de la sous-unité c modifié avec le DCCD a montré que les parties cyclohexyle de la molécule sont trop grosses pour occuper la poche de liaison du proton et qu'en fait, les deux cycles sont positionnés vers l'extérieur de l'anneau de la sous unité c. Cette particularité sous-entend que l'encombrement stérique causé par l'urée N-acyles sur la sous-unité a bloque la rotation de l'anneau de sous unité c (Pogoryelov *et al.*, 2010). L'étude de (Toei and Noji, 2013) a démontré qu'effectivement, la rotation était bloquée suite à l'encombrement stérique entre la sous-unité a et c, mais qu'en plus il y a une force de

torsion de la tige périphérique (composé de la sous-unité δ et du complexe b2) qui empêche l'anneau de sous unité c de tourner dans l'autre sens (**Figure 11**). Cet inhibiteur fonctionne sur l'ensemble des ATP synthases connues jusqu'à présent, soit celles des bactéries, des mitochondries et des chloroplastes (Deckers-Hebestreit and Altendorf, 1996).

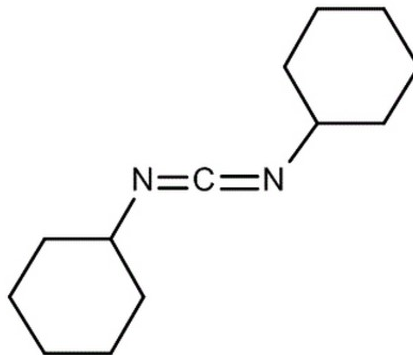


Figure tirée de Wikipédia
(<https://en.wikipedia.org/wiki/N,N%27-dicyclohexylcarbodiimide>)

Figure 10. Structure du : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide , DCCD

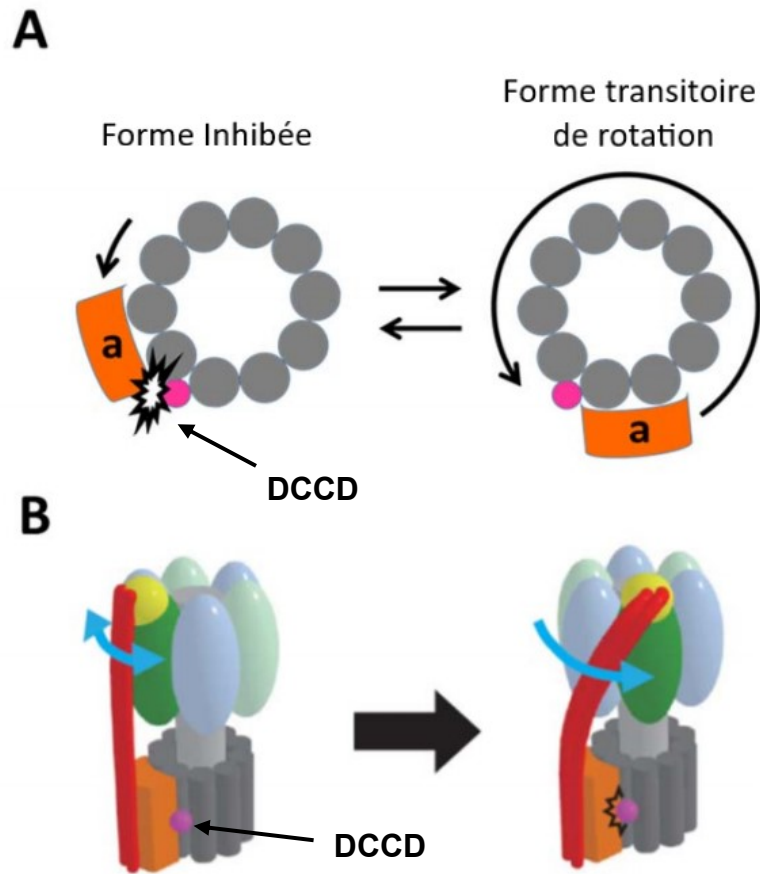


Figure modifiée de (Toei and Noji, 2013)

Figure 11. Les modèles de l'inhibition de F_0F_1 par le DCCD.

A) Le modèle d'activation transitoire la partie F_0 couplée au DCCD, lorsque vu de la partie F_1 . La rotation de la tige périphérique de F_0F_1 est transitoirement activée et bloquée encore au même endroit après une rotation. B) Le modèle de F_0F_1 inhibé par le DCCD qui montre le « twist » dans la tige périphérique. La partie F_1 commence sa rotation dans le but de synthétiser de l'ATP, tandis que la partie F_0 est bloquée par le DCCD, ce qui provoque le « twist » de la tige périphérique.

1.1.4.5. Découpleur de la chaîne de transport des électrons

Les découpleurs de la chaîne de transport d'électrons sont des molécules qui inhibent la relation de couplage entre la chaîne de transport d'électron et les réactions de phosphorylation. Ces composés permettent donc aux protons à l'extérieur de la membrane de traverser la membrane sans passer par l'ATP synthétase. Les découpleurs sont en mesure de dissiper presque totalement le gradient de protons généré par les pompes de la chaîne de transport d'électrons (Terada, 1990) .

1.1.4.5.1. 2,4-dinitrophenol (DNP)

Certains inhibiteurs possèdent un mécanisme non spécifique pour inhiber la production de l'ATP, c'est d'ailleurs le cas du 2,4-dinitrophenol (DNP). Le DNP est en mesure de s'insérer dans les membranes des mitochondries ou bactériennes, la rendant ainsi perméable aux protons. Effectivement, dans le cas du DNP, ces deux groupements électroattracteurs (NO_2) stabilisent la forme chargée en "attirant" un proton (**Figure 12**).

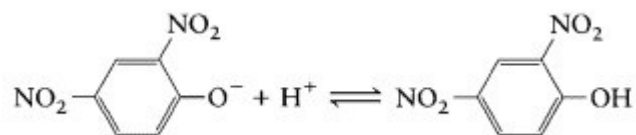


Figure tirée du livre *Molecular Cell Biology, 4th edition* (Lodish, Harvey. Baltimore, David. Berk, Arnold. Zipursky, S. Matsudaira, Paul. Darnell, 1995).

Figure 12. Stabilisation de la forme chargée négativement du DNP avec un proton.

Ainsi, le DNP peut court-circuiter le potentiel de membrane en liant les protons à l'extérieur de la membrane et en les faisant rentrer dans la cellule/mitochondrie sans passer par l'ATP synthétase. Il agit comme une navette à protons, dissipant ainsi la force proton motrice nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase. En dérégulant la régulation de la chaîne de transport d'électrons, il permet au NADH de se faire oxyder, peu importe le niveau d'ADP dans la cellule/mitochondrie (McLaughlin, 1972; Grundlingh *et al.*, 2011).

1.1.4.5.2. CCCP

Les molécules comme le CCCP (**Figure 13**) (carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone) ainsi que le FCCP (p-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazone) sont de puissants découpleurs de membranes. Si on prend en exemple le CCCP, cet acide faible liposoluble délocalise uniformément sa charge négative, ce qui fait que le champ électrique autour de cette molécule est très faible. Cette particularité permet à cet anion de diffuser librement dans les membranes lipidiques, alors que normalement, les molécules chargées ne peuvent pas se diffuser dans les membranes. Lorsque cet anion va rencontrer un proton dans l'espace périplasmique, celui-ci va se protoner et entrer dans la bactérie pour libérer son proton et ressortir rapidement de la cellule sous forme d'anion. Cette réaction va ainsi détruire le potentiel membranaire en faisant entrer des protons à l'intérieur de la cellule sans les faire passer par le complexe de l'ATP synthétase (Heytler and Prichard, 1962; Hirose, Yaginuma and Inada, 1974).

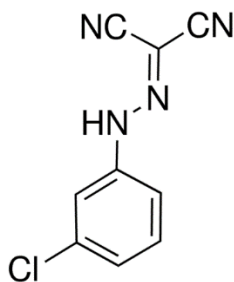


Figure tirée de Wikipédia

(https://en.wikipedia.org/wiki/Carbonyl_cyanide_m-chlorophenyl_hydrazone)

Figure 13. La structure du CCCP (carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone)

1.1.5.6. Le mode d'action de la bédaquiline

La bédaquiline (**Figure 14**) appartient à une nouvelle classe d'antibiotique nommé les diarylquinolines, qui agit sur la sous-unité C des mycobactéries. Il s'agit d'une nouvelle molécule qui est maintenant utilisée pour le traitement de la tuberculose résistante aux antibiotiques. Ce composé est spécifique aux mycobactéries et possède peu d'affinité pour les mitochondries (Koul *et al.*, 2007; Preiss *et al.*, 2015). Il s'agit d'une cible thérapeutique intéressante puisqu'il a été démontré que le complexe d'ATP synthétase est essentielle chez les mycobactéries, autant sur des milieux possédant des sources d'énergie fermentable que non fermentables (Tran and Cook, 2005; Koul *et al.*, 2007). De plus, les F₁F_o-ATP synthétases mycobactériennes possèdent plusieurs différences physiologiques si on les compare avec les F₁F_o-ATP des autres bactéries. La différence majeure est que leur ATP synthétase est incapable de tourner dans le sens de l'hydrolyse de l'ATP. Elle ne peut que catalyser la synthèse de l'ATP (Haagsma *et al.*, 2010). Cette particularité permet de comprendre pourquoi ce genre bactérien est plus sensible à ce type de molécules, puisqu'en général, les autres genres bactériens

compensent souvent une inhibition de l'ATP synthase par une augmentation du métabolisme du carbone et synthétiseraient de l'ATP grâce à la phosphorylation au niveau du substrat (Jensen and Michelsen, 1992; Santana *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 2014; Hards *et al.*, 2015).

Plus précisément, la bédaquiline lie la sous-unité c de l'ATP synthétase mycobactérienne, à l'interface entre la sous unité c et a. La perturbation de l'intégrité de la sous-unité c mène à un cycle de protons futile qui n'est pas couplé à l'ATP synthétase. Le flux de protons serait plutôt délocalisé vers les cytochromes bd au lieu des composantes de la chaîne respiratoire telle le cytochrome bc1-aa3, qui aurait transloqué les protons vers le complexe de l'ATP synthétase (Hards *et al.*, 2015). Afin d'éviter l'hyperpolarisation de la membrane, le cytochrome bd expulsera les protons à l'extérieur de la cellule, puisqu'une hyperpolarisation de la force proton motrice a été associé à une augmentation de la production de «Reactive oxygen species» (ROS) (Rao *et al.*, 2008).

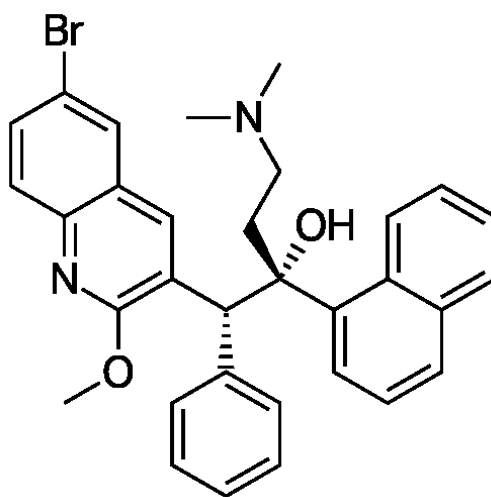


Figure tirée de Wikipédia

(<https://en.wikipedia.org/wiki/Bedaquiline>)

Figure 14. Structure de la bédaquiline

1.2. La tomatidine et ses dérivés

Certaines plantes ont la capacité de synthétiser des molécules qui ont des effets contre une grande variété de microorganismes (González-Lamothe *et al.*, 2009). Certains composés peuvent inhiber ou tuer directement les bactéries ou les champignons, certains sont en mesure d'augmenter l'activité antimicrobienne d'antibiotiques, tandis que d'autres peuvent altérer la virulence de certaines souches (González-Lamothe *et al.*, 2009).

La tomatidine (**Figure 15A**) est un alcaloïde stéroïdien provenant des tomates qui sert de précurseur à la synthèse d'un métabolite de défense des plantes, le stérol glycol alcaloïde α -tomatine (Cárdenas *et al.*, 2015). Ce dernier a déjà été caractérisé comme agent antifongique et possède des propriétés perturbatrices de membranes. Effectivement, la tomatine a la capacité de former des complexes avec le cholestérol ainsi que l'ergostérol (Roddick, 1979; Sandrock and VanEtten, 1998; Dorsaz *et al.*, 2017). Par contre, la version aglycone de l' α -tomatine, c'est-à-dire la tomatidine, perd son activité antifongique contre la majorité des phytopathogènes et ne possède pas la capacité de lier les stérols (Roddick, 1979; Sandrock and VanEtten, 1998). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré une panoplie de propriétés pour la tomatidine : antiparasitaire (Medina *et al.*, 2012, 2015), antiinflammatoire (Chiu and Lin, 2008), et même un ralentissement du vieillissement (Fang *et al.*, 2017). Dans le laboratoire du professeur François Malouin, il a été démontré que la tomatidine possède une activité bactéricide contre les *Bacillales* de type SCV, mais cette molécule ne possède pas d'activité évidente contre les souches au phénotype normal (Mitchell *et al.*, 2011; Guay *et al.*, 2018). Par contre, lorsqu'utilisée avec les aminoglycosides, la tomatidine agit en synergie avec cette classe et possède une activité antibiotique contre les souches prototype et même les souches résistantes comme les SARM (Mitchell *et al.*, 2011, 2012; Boulanger *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré que la tomatidine est efficace pour éliminer la forme persistante des SCV intracellulaires lors d'un test d'invasion cellulaire. De surcroît, les concentrations de tomatidine utilisées pour obtenir cet effet

bactéricide étaient non cytotoxiques (Mitchell *et al.*, 2011). Dans le but de comprendre davantage le mode d'action de la tomatidine ainsi que ses propriétés, des études de relation structure-activité (SAR) ont été effectuées et plusieurs dérivés de la tomatidine ont été synthétisés, grâce à une collaboration avec le laboratoire du professeur Éric Marsault (département de pharmacologie de l'Université de Sherbrooke) (Chagnon *et al.*, 2014). Dans l'article de Chagnon *et al.* 2014, une molécule est sortie du lot, soit FC04-100 (**Figure 15B**). En plus de conserver son activité contre les souches au phénotype SCV, cette molécule possède une activité bactéricide contre les souches prototypes (Guay *et al.*, 2018). En outre, il a aussi été démontré que FC04-100 prévenait le développement d'un haut niveau de résistance contrairement à la tomatidine (Guay *et al.*, 2018; Lamontagne Boulet *et al.*, 2018).

Afin de mieux comprendre le mode d'action de ces molécules, des pressions sélectives de la tomatidine et de FC04-100 ont été effectuées sur des souches SCV de *S. aureus*. Les isolats résistants sélectionnés possédaient un profil de résistance similaire autant pour tomatidine que pour FC04-100. Cette propriété suggère que les deux molécules ont probablement le même mode d'action. Par contre, comme mentionné plus haut, le plus haut niveau de résistance atteint pour FC04-100 était de 2 µg/ml tandis que les mutants résistants à la tomatine étaient > 64 µg/ml. Par la suite, le séquençage a indiqué que les mutants résistants possédaient des mutations dans le même gène, soit le gène *atpE*, qui code pour la sous-unité c de l'ATP synthétase. Cela suggère que la tomatidine et FC04-100 ont probablement la même cible, soit cette sous-unité.

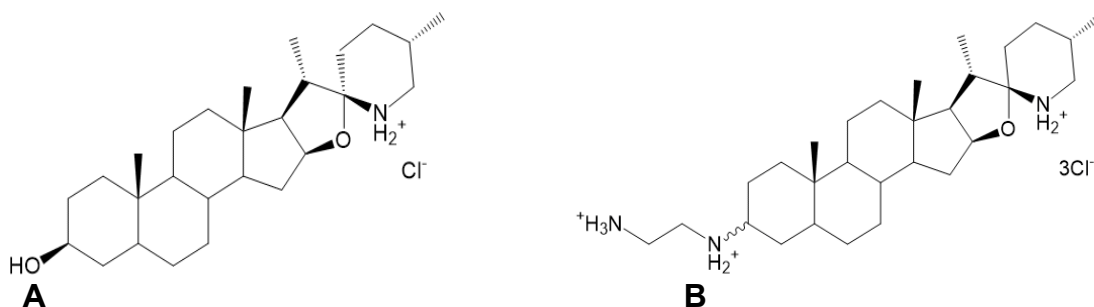


Figure modifiée de Lamontagne Boulet *et al.* 2018

Figure 15. Structures de la tomatidine (A) et du dérivé FC04-100 (B).

La ligne en vague indique une stéréochimie pour le composé (groupement vers l'avant ou vers l'arrière) menant aux diastéréoisomères FC-majeur et FC-mineur.

1.3 Le projet de maîtrise, hypothèse et objectifs

Comme mentionné précédemment, notre laboratoire, en collaboration avec les laboratoires de Kamal Bouarab et Éric Marsault, avons découvert que la tomatidine, un alcaloïde de plante, possédait un effet antibiotique sur les bactéries. Plus précisément, la tomatidine possède des effets antibiotiques sur les SCVs. Néanmoins, afin de pouvoir éventuellement l'utiliser comme traitement, nous devons tout d'abord élucider son mode d'action ainsi qu'optimiser la molécule en évaluant divers analogues pour tenter d'avoir la meilleure activité possible. Nous devons démontrer qu'une mutation dans la sous-unité C de l'ATP synthétase permettait l'obtention de mutant résistant à la tomatidine. Il serait donc raisonnable de croire que la cible potentielle de la tomatidine est l'ATP synthétase. Afin de démontrer que la cible de la tomatidine est la sous-unité c de l'ATP synthétase, j'aurai à développer un essai qui permet de mesurer l'inhibition de la production de l'ATP chez les bactéries et optimiser cet essai afin qu'il puisse aussi être utilisé pour le phénotype SCV des bactéries (celui-ci possède une production d'énergie réduite suite à des mutations dans la chaîne de transport

d'électrons). Par la suite, si inhibition de l'ATP il y a, je pourrai comparer l'activité de la tomatidine sur plusieurs souches comme *S. aureus* SCV résistants à la tomatidine ainsi que sur des souches de *E. coli* et des mitochondries humaines, dans le but de déterminer la spécificité d'action de nos possibles composés inhibiteurs. De cette façon, il sera possible de démontrer biochimiquement que la cible de la tomatidine est l'ATP synthétase.

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Titre : Tomatidine, a lead antibiotic molecule that targets *Staphylococcus aureus* ATP synthase subunit C.

Maxime Lamontagne Boulet^{1#}, Charles Isabelle^{1#}, Isabelle Guay^{1#}, Eric Brouillette¹, Jean-Philippe Langlois¹, Pierre-Étienne Jacques¹, Sébastien Rodrigue¹, Ryszard Brzezinski¹, Pascale B. Beauregard¹, Kamal Bouarab¹, Kumaraswamy Boyapelly², Pierre-Luc Boudreault², Éric Marsault², and François Malouin^{1*}

Les trois premiers auteurs ont contribué significativement de façon équivalente.

Ce travail indique pour la première fois la cible biologique de la tomatidine ainsi que son dérivé FC04-100, la sous-unité c de l'ATP synthétase chez les *Bacillales*.

Contribution :

Maxime Lamontagne Boulet : Étudiant gradué sous la direction du Pr F. Malouin. Il a effectué les manipulations biologiques menant à la sélection de mutants résistants à la tomatidine et FC04-100, les tests de concentrations minimales inhibitrices initiaux ainsi qu'une partie des analyses des mutations et séquences du gène *ccpA* et *atpE*. Les résultats attribués à son travail ont été rapporté dans son mémoire de maîtrise, Détermination de la cible moléculaire et du mode d'action de la tomatidine et dérivés, mai 2017.

Charles Isabelle : En tant qu'étudiant gradué sous la direction du Pr F. Malouin, j'ai développé l'essai d'inhibition de l'ATP synthétase, optimisé l'essai pour la tomatidine et ses dérivés sur les SCV et les SCV résistants à la tomatidine et FC04-100. J'ai effectué les tests de sélectivités des molécules sur les mitochondries en développant

ces mêmes tests chez les mitochondries humaines. J'ai aussi déterminé le niveau basal de production d'ATP de *S. aureus* sauvage versus son SCV et les SCV résistants. J'ai aussi mesuré, calculé et montré toutes les corrélations entre l'inhibition de l'ATP synthétase, l'affinité des molécules inhibitrices (IC50) et les CMI de ces inhibiteurs. Ceci pour valider par une preuve biochimique que la cible de ces molécules était bien l'ATP synthétase.

Enfin, j'ai rédigé plus de 50% du premier jet de l'article, produit la plupart des figures pour publication et effectué toutes les corrections de l'article suggérés par mes co-auteurs et les évaluateurs du journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy avant la publication finale.

Isabelle Guay : Étudiante graduée sous la direction du Pr F. Malouin. Elle a effectué les manipulations biologiques menant à la sélection de mutants résistants à la tomatidine et FC04-100, les tests de concentrations minimales inhibitrices initiaux ainsi qu'une partie des analyses des mutations et séquences du gène *ccpA* et *atpE*. Les résultats attribués à son travail ont été rapporté dans son mémoire de maîtrise, Détermination du mode d'action et de la cible cellulaire de la tomatidine chez *Staphylococcus aureus*, février 2014.

Éric Brouillette : Professionnel de recherche sous la direction du Pr F. Malouin. Il a aidé à la logistique de l'essai d'inhibition de l'ATP synthétase.

Jean-Philippe Langlois : Il a effectué la preuve génétique et les tests de susceptibilités chez *S. aureus* et *Bacillus subtilis*.

Pierre-Étienne Jacques : Le Pr Jacques a effectué le traitement bio-informatique et l'analyse des résultats menant à l'identification des gènes d'intérêts.

Sébastien Rodrigue : Le Pr Rodrigue a guidé I. Guay dans les manipulations menant aux séquençages génomiques des isolats résistants à la tomatidine, le traitement bio-informatique des séquences et l'analyse de ces résultats.

Ryszard Brzezinski : Le Pr Brezezinski a réalisé les modèles de la sous-unité C de l'ATP synthétase

Pascale B. Beauregard : La Pre Beauregard a guidé Jean-Philippe Langlois dans ses expériences de manipulation génétique de *Bacillus subtilis*.

Kamal Bouarab : Le Pr Bouarab et le Pr Malouin ont initialement planifié les expériences pour mettre en évidence les propriétés antibactériennes de la tomatidine. Il a contribué au plan de travail et l'écriture du manuscrit.

Kumaraswamy Boyapelly : Postdoctorant dans le laboratoire du Pr Marsault. Il a contribué à la production d'analogues de la tomatidine et FC04-100.

Pierre-Luc Boudreault : Professionnel de recherche dans le laboratoire du Pr Marsault. Il a contribué à la production d'analogues chimique de la tomatidine et FC04-100.

Éric Marsault : Le Pr Marsault a supervisé la synthèse des analogues de la tomatidine et la séparation des deux stéréoisomères de FC04-100. Il a aussi contribué au plan de travail et l'écriture du manuscrit.

François Malouin : Le Pr Malouin a été le directeur de recherche des étudiants gradués impliqués dans ce travail (Maxime Lamontagne Boulet, Charles Isabelle, d'Isabelle Guay et Jean-Philippe Langlois). Il a contribué au plan de travail, l'écriture du manuscrit et est l'auteur de correspondance.

L'article a été accepté et publié en ligne le 2 avril 2018 dans le journal « **Antimicrobial Agents and Chemotherapy®** ».

Lamontagne Boulet, M. *et al.* (2018) 'Tomatidine, a lead antibiotic molecule that targets *Staphylococcus aureus* ATP synthase subunit C', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018 vol: 62 (6) pp: e02197-17

2.1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) est l'une des principales causes d'infections nosocomiales mortelles. La découverte d'antibiotiques anti-*Staphylococcus* et de nouvelles classes de médicaments non sensibles aux mécanismes de résistance partagés par les bactéries est plus que nécessaire. Nous avons récemment démontré que la tomatidine (TO), un alcaloïde stéroïdien de plantes solanacées, possède une activité antibactérienne contre les « small colony variants » (SCVs) de *S. aureus*, la forme persistante de cette bactérie qui a été associée à la récurrence des infections. Dans cet article, en utilisant l'analyse génomique des souches *S. aureus* résistantes à la TO, générées in vitro pour identifier les mutations dans les gènes impliqués dans la résistance, nous avons identifié l'ATP synthase bactérienne comme cible cellulaire. Des alignements de séquences ont été effectués pour mettre en évidence les séquences modifiées et les conséquences structurales des mutations ont été évaluées dans des modèles structuraux. La surexpression du gène *atpE* dans les SCV de *S. aureus* ou l'introduction de la mutation trouvée dans le gène *atpE*, de l'un des mutants de *S. aureus* résistant à la TO, dans le gène *atpE* de *Bacillus subtilis* a fourni une résistance à la TO et validé l'identité de la cible cellulaire. FC04-100, un dérivé TO qui possède également une activité contre des souches non-SCV, prévient le développement d'un haut niveau de chez les souches prototypiques et limite le niveau de résistance observé dans les SCV. Un essai d'inhibition de l'ATP synthétase a permis l'observation d'une corrélation entre l'activité de l'antibiotique et l'inhibition de l'ATP synthétase. L'indice de sélectivité (inhibition de la production d'ATP par les mitochondries par rapport à l'ATP synthase bactérienne) est estimé à $>10^5$ fois pour FC04-100.

2.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE

Titre: Tomatidine, a lead antibiotic molecule that targets *Staphylococcus aureus* ATP synthase subunit C.

Maxime Lamontagne Boulet^{1#}, Charles Isabelle^{1#}, Isabelle Guay^{1#}, Eric Brouillette¹, Jean-Philippe Langlois¹, Pierre-Étienne Jacques¹, Sébastien Rodrigue¹, Ryszard Brzezinski¹, Pascale B. Beauregard¹, Kamal Bouarab¹, Kumaraswamy Boyapelly², Pierre-Luc Boudreault², Éric Marsault², and François Malouin^{1*}

¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1

²Département de Pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4

Running Title: ATP synthase the target of Tomatidine.

Contributed equally to the work.

* Corresponding author mailing address: Université de Sherbrooke, Département de Biologie, Faculté des Sciences, 2500 Boul. Université, Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1. Phone: (819) 821-8000, ext. 61202. Fax: (819) 821-8049.

E-mail: francois.malouin@usherbrooke.ca

2.2.1. ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a leading cause of deadly hospital-acquired infections. The discovery of anti-*Staphylococcus* antibiotics and new classes of drugs not susceptible to the mechanisms of resistance shared among bacteria is imperative. We recently showed that tomatidine (TO), a steroidal alkaloid from solanaceous plants, possesses potent antibacterial activity against *S. aureus* small colony variants (SCVs), the notoriously persistent form of this bacterium that has been associated with recurrence of infections. Here, using genomic analysis of in vitro-generated TO-resistant *S. aureus* strains to identify mutations in genes involved in resistance, we identified the bacterial ATP synthase as the cellular target. Sequence alignments were performed to highlight the modified sequences and the structural consequences of the mutations were evaluated in structural models. Overexpression of the *atpE* gene in *S. aureus* SCVs or introducing the mutation found in the *atpE* gene of one of the high-level TO-resistant *S. aureus* mutant into the *Bacillus subtilis atpE* gene provided resistance to TO and further validated the identity of the cellular target. FC04-100, a TO derivative which also possesses activity against non-SCV strains, prevents high-level resistance development in prototypic strains and limits the level of resistance observed in SCVs. An ATP synthesis assay allowed the observation of a correlation between antibiotic potency and ATP synthase inhibition. The selectivity index (inhibition of ATP production by mitochondria vs. bacterial ATP synthase) is estimated to be $>10^5$ -fold for FC04-100.

2.2.2. INTRODUCTION

Antibiotic resistance is now an overwhelming health problem, with estimates reaching 10 million deaths per year worldwide by 2050 if nothing is done to slow down the resistance epidemic, and if no new antibiotics are discovered to fight resistant pathogens (1, 2). Most of the antibiotics developed in the last decade are still based on scaffolds identified 60 years ago (3). As an adaptive and evolutionary response to this limited scaffold diversity, bacteria acquired efficient resistance mechanisms that can be transferred among microbial species (4–6). There are multiple challenges in the discovery of novel bioactive molecules (7) and only few antibiotics based on new scaffolds reaching new validated molecular targets are present in the current pharmaceutical pipeline (3). We report here the elucidation of the mode of action of tomatidine (TO) and analogs, which represent a new chemical scaffold targeting the bacterial ATP synthase. Noteworthy, the bacterial ATP synthase is now recognized as a clinically relevant and validated molecular target with the recent FDA approval of bedaquiline, a structurally distinct antitubercular drug having a similar mode of action (8).

Since the bacterial ATP synthase has similarity to the human mitochondrial counterpart, selectivity of drugs based on this molecular target is imperative. Like bedaquiline, which is highly selective for the mycobacterial ATP synthase (9, 10), TO selectively targets species of the *Bacillales*, namely *Staphylococcus*, *Listeria*, and *Bacillus* spp. (11–13). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) are often associated with recurrent and difficult-to-treat hospital- or community-acquired infections (14, 15), and are among the bacterial threats identified by the CDC that require immediate attention (16). MRSA are also found in livestock and domestic pets, and transmissions from animals to humans have often been reported (17–19). In addition, staphylococci infections are also associated with food poisoning (20), similar

to several pathogens that belong to the order of *Bacillales*. For example, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* can cause gastro-intestinal infections as well as food poisoning (21, 22). Though *L. monocytogenes* infections are relatively rare, they can lead to invasive listeriosis, cause severe symptoms and be fatal. Persistence of this pathogen in food is a major problem and is associated with transmission to humans (23). *Bacillus* spp. are well known for their ability to form endospores that can persist in the environment (24). Among pathogenic *Bacillus* species, *B. anthracis* can cause anthrax by contact with infected food-producing animals, as well as by direct contact with endospores when used as a biological weapon (25). However, *S. aureus* remains the most clinically prominent pathogen of this group.

Among the mechanisms that allow *S. aureus* to cause persistent infection, is its ability to adopt a slow-growth phenotype called small-colony variants (SCVs). SCVs have been associated with chronic and persistent infections, and are often recovered from lungs of patients with cystic fibrosis or from osteomyelitis, septic arthritis, bovine mastitis and colonization of orthopedic devices (26–29). SCVs possess an impaired respiratory chain, which affects their oxidative metabolism, causes a slow growth and changes the expression of virulence factors (28, 30). The reduced proton motive force (PMF) of SCVs reduces their susceptibility to aminoglycosides, which rely on an active PMF to cross the cell membrane barrier. Respiratory deficiency is often caused by mutation in genes involved in hemin or menadione biosynthesis, which are important components of the respiratory chain (28). SCVs have the ability to produce large quantities of biofilm (31–33), and also persist within non phagocytic host cells (12, 34, 35), enhancing their ability to survive in the presence of antibiotics and host immune factors. Switching between the normal and SCV phenotypes seems to be part of *S. aureus* pathogenesis and is a phenomenon that may promote recurrence and chronicity of infections (36). Our laboratory extensively documented the very potent (nM range) and selective antibacterial activities of TO against SCVs of *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Listeria* spp. (11–13, 37). We also investigated several structural analogs of TO in

order to better understand its structure-activity relationship (37), and identified a promising TO derivative possessing a diamino group replacing the 3 β -hydroxyl group of TO (FC04-100, Fig 1). In addition to its anti-SCV activity, FC04-100 interestingly gained antibacterial activity against prototypical strains (13). The mode of action of TO and analogs was clearly associated with the respiratory chain but its molecular target was unknown until now.

The aim of this study was thus to identify the molecular target of TO and its analog FC04-100. We studied drug-resistant *S. aureus* SCVs raised via selective pressure to TO and used whole-genome sequencing to highlight the molecular target associated with resistance. The subunit C of the bacterial ATP synthase emerged as the molecular target of TO and FC04-100.

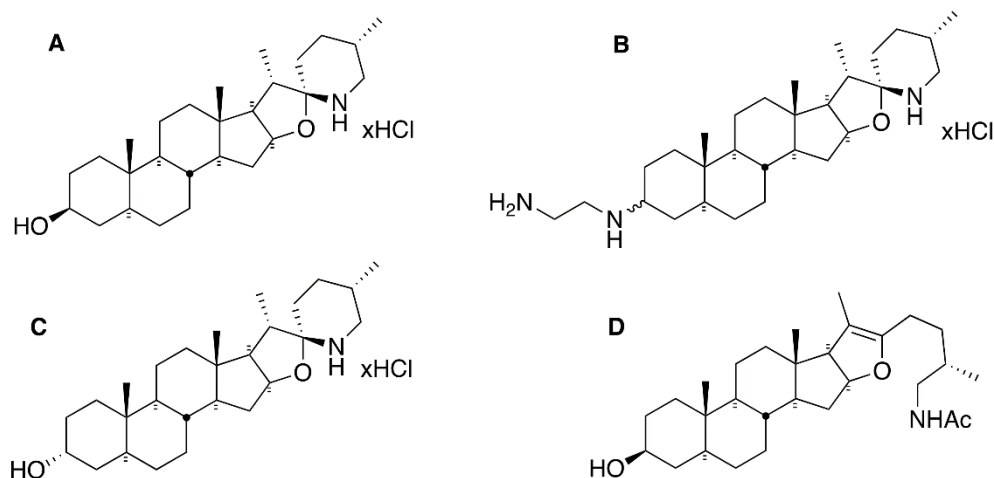


Figure 1. Structures of TO and analogs used in this study.

(A) TO is characterized by 6 rings, 12 stereogenic centers, a 3 β -hydroxyl group, and spiro-fused rings in the form of an aminoketal. (B) FC04-100 contains a diamine in position 3. The two epimers in position 3 were separated as major (M) and minor (m) although due to the complexity of nuclear magnetic resonance signals, their respective

structures could not be unambiguously assigned. (C) TO analog FC02-190 shows an α -hydroxyl group in position 3. (D) Analog FC04-116 shows an open spiroaminoketal moiety.

2.2.3. RESULTS

2.2.3.1. Generation and selection of mutants.

In order to identify the molecular target of TO, we raised TO-resistant mutants in a *S. aureus* SCV strain (Newbould Δ *hemB*). These mutants were selected by serial passage in broth containing two-fold dilutions of TO, and 3 isolated colonies were picked from passages of interest (i.e., showing an increase of TO MIC). A low-level resistance for TO was observed at passage 7 (isolates named P07intR-1, -2, -3; “intR” for intermediate resistance) and similarly at passages 11 (isolates P11intR-1, -2, -3) and 20 (isolates P20intR-1, -2, -3), for which the TO MIC increased from 0.06 to 0.25-1 μ g/mL (Table 1). High-level resistance was only observed after 30 passages (isolates named SaR1-1, -2, -3) with TO MIC >64 μ g/mL. These serial passages were performed two more times, and the same stepwise increase in TO resistance was observed, with a high level of resistance reached at passage 30 (isolates named SaR3-1, -2, -3 and SaR4-1, -2, -3), except that the low-level resistance appeared at passages 15 and 18, respectively. Serial passages were also performed another time starting with a low-level resistant isolate from the initial passage 7 (i.e., P07intR-1), and these steps also led to a high-level resistance at passage 30 (isolates named SaR2, -1, -2, -3). The mutant description and MICs for TO, FC04-100 stereoisomers (FcM and Fcm) and gentamicin are reported in Table 1. Note that we previously reported the MICs of the FC04-100 mixture of stereoisomers to be 8-16 and 0.5-2 μ g/mL for prototypic *S. aureus* and SCVs, respectively (13, 37). Table 1 shows that FcM is the most potent component of the FC04-100 mixture.

Tableau 1. Susceptibility profile of the studied *S. aureus* strains and TO-resistant mutants selected after serial passage in presence of TO or FC04-100

Strains or clones ^a	MIC (µg/mL) ^b			
	TO	FcM	Fcm	GEN
<i>S. aureus</i> Newbould	>128	2	8	0.25
<i>S. aureus</i> Newbould $\Delta hemB$	0.06	0.06	2	8
P07intR-1,-2,-3*	0.25	0.5-1	4	8
P11intR-1,-2,-3*	0.25-0.5	0.5-1	4	8
P20intR-1,-2,-3*	0.25-1	1	4	8
SaR1-1,-2,-3 [#]	>64	2	8	8
SaR2-1,-2,-3 [§]	>64	2	8	8
SaR3-1,-2,-3 [#]	>64	2	8	8
SaR4-1,-2,-3 [#]	>64	2	8	8
SaR5-1,-2,-3 [†]	>64	2	8-16	8-16
SaR6-1,-2,-3 [†]	>64	2	8	8

^aClones of *S. aureus* Newbould $\Delta hemB$ are indicated as follows: *, clones selected after 7, 11, or 20 passages, respectively, in the presence of TO; #, clones selected after 30 passages in the presence of TO; §, clones from a clone of *S. aureus* Newbould $\Delta hemB$ with low-level of resistance to TO (P07intR-1) after an additional 30 passages in the presence of TO; †, clones selected after 30 passages in the presence of FC04-100. ^bTO, tomatidine; FcM, FC04-100 major stereoisomer; Fcm, FC04-100 minor stereoisomer; GEN, gentamicin. For the MIC, the “>” sign denotes the highest concentration tested.

For all mutants with a high-level of resistance to TO, and raised by selective pressure from TO (SaR1, SaR2, SaR3, SaR4; Table 1), a cross-resistance was observed with the TO analog FC04-100 (both stereoisomers FcM and Fcm). Increases in resistance for TO represented >1024-fold (the MIC increased from 0.06 µg/ml to >64 µg/ml), but increases in resistance for FcM was only 32-fold (from 0.06 to 2 µg/ml) and 4-fold for Fcm (from 2 to 8 µg/ml) (Table 1). Interestingly, the drug-resistant SCVs selected with FC04-100 (Table 1, mutants SaR5 and SaR6) showed the same susceptibility profiles as those selected with TO (i.e., SaR1, SaR2, SaR3, and SaR4). This strongly suggests a similar mode of action for both TO and its analog FC04-100, although the latter preserves some noticeable activity against TO-resistant mutants.

Since both FC04-100 stereoisomers (FcM and Fcm) possess some antibacterial activity against prototypic strains of *S. aureus* (MIC 2 to 8 µg/mL against strain Newbould, Table 1), we tried to raise mutants using selective pressure by FC04-100. Using the same approach as for TO, we failed to obtain any FC04-100-resistant mutants from prototypical *S. aureus*. Indeed, the MIC of FC04-100 remained the same toward strain Newman throughout the 30 passages.

2.2.3.2. Spontaneous mutation frequency for TO resistance and mutant prevention concentration (MPC).

The frequency of spontaneous mutations leading to low-level resistance to TO (MIC 0.25-1 µg/mL; intR strains, Table 1) was measured by spreading strain Newbould Δ *hemB* on agar supplemented with TO at 0.5 µg/ml. Using this selection pressure, the frequency was 1.25-1.96 x10⁻⁸. Using higher concentrations of TO in selective plates (16 and 32 µg/mL of TO), the mutation frequency dropped and ranged from < 5.88 x 10⁻⁹ to 2.32 x 10⁻⁸. There were no more colonies detected on plates containing 64 µg/mL of TO, i.e., a concentration equivalent to the MIC of the high-level resistant mutants; Table 1). The MPC of TO is thus 64 µg/mL, i.e., the lowest drug concentration preventing mutant colonies, as observed on both technical and biological triplicates.

The frequency of spontaneous mutations leading to FcM resistance, as determined on plates containing 2 and 4 µg/mL FcM, ranged from < 5.88 x 10⁻⁹ to 1.79 x 10⁻⁸. The MPC of FcM was 8 µg/mL. For comparison, we used rifampicin as reference antibiotic. The frequency of spontaneous mutations leading to rifampicin resistance on plates containing 8 µg/mL of rifampicin (initial MIC of 0.015 µg/mL), was 0.48-1.04 x 10⁻⁷. The mutation frequency for high-level resistance to rifampicin was greater than that observed for low- and high-level resistance to TO or FcM.

2.2.3.3. Identification of mutations associated with resistance.

Whole-genome sequences of the first series of resistant mutants (P07intR-1, -2, -3, P11intR-1, -2, -3, P20intR-1, -2, -3, and SaR1-1, -2, -3; Table 1) were compared to the parental SCV strain. For each of these 12 isolates, between 22 and 87 single nucleotide

variants (SNVs) and indels were identified. Only the SNVs and indels common to each 3 isolates of a given passage were considered associated with resistance. This way, we identified only two mutations shared by these independently selected resistant isolates (Fig S1 and S2). A base substitution (G to T in position 446) was found in the low-level TO-resistant strains (represented by isolates from passages 7, 11 and 20) in the *ccpA* gene, which encodes the catabolite control protein A, a key metabolic regulator in low-GC Gram positive bacteria. This base substitution leads to an amino acid change (G149V) shown in Fig S1. The second mutation, found in high-level TO-resistant isolates (i.e., SaR1-1, -2, -3 from passage 30), is a base substitution (G to T in position 49) in the *atpE* gene which encodes the ATP synthase subunit C. Subunit C forms the rotor which turns when a proton flux enters the ATP synthase to produce the energy necessary to synthesize ATP (38). This mutation also leads to an amino acid change (A17S) (isolates SaR1-1, -2, -3; Fig S2). Mutations in *ccpA* and/or *atpE* were confirmed by PCR amplification and Sanger sequencing for all isolates submitted to whole-genome sequencing (i.e., P07intR-1, -2, -3, P11intR-1, -2, -3, P20intR-1, -2, -3, and SaR1-1, -2, -3).

Following these results, other independent serial passages in the presence of TO were performed with *S. aureus* Newbould Δ *hemB*, also starting with an isolate with low-level TO resistance (i.e., P07int-R-1, an isolate from the initial passage 17) as described in the Materials and Methods section. These serial passages yielded high-level TO-resistant isolates at passage 30. PCR amplification and Sanger sequencing for the *ccpA* and *atpE* target genes were performed on those isolates. The same base substitution in the *ccpA* gene was found in all new high-level TO-resistant isolates selected in the presence of TO (SaR2, SaR3, SaR4 [three isolates each]; Fig S1), which confirmed the involvement of this gene in TO resistance. For the *atpE* gene, a different base substitution was found in high-level TO-resistant isolates (C77T) which leads to a different amino acid change (S26L) than initially found in the SaR1 series of isolates (see SaR2, SaR3, SaR4 [three isolates each]; Fig S2).

Genes *ccpA* and *atpE* were also examined for drug-resistant isolates selected by serial passages with TO analog FC04-100. For these series of isolates (SaR5 and SaR6 [three isolates each]), no mutation was found in the *ccpA* gene (Fig S1), consistent with the fact that only one level of resistance was found for the analog (Table 1). For the *atpE* gene, two additional and different base substitutions were found (G52T and T139C). These two mutations also led to different amino acid changes (respectively G18C and F47L, Fig S2). Overall, the low-level resistance to TO (MIC 0.25-1 µg/mL) was associated to a specific mutation in CcpA (G149V), whereas the high-level resistance to TO (MIC > 64 µg/mL) was associated with both the CcpA mutation and a mutation in AtpE (either A17S or S26L). In contrast, the G18C and F47L substitutions in AtpE were associated only with the highest level of resistance to FC04-100 (MIC of 2 µg/ml for FcM).

2.2.3.4. The *atpE* gene is conserved among *Bacillales*

TO and its analog possess an activity spectrum specific to the order *Bacillales* (13), which includes pathogens like *S. aureus*, *Bacillus anthracis* and *Listeria monocytogenes*. We thus compared the ATP synthase subunit C (AtpE) amino acid sequences among *Bacillales* and non-targeted species (Fig 2).

Bacillales

S. aureus NCTC 8325 MNL--IAAAIAIGLSALG**AG**IGNGLIV**SRT**VEGVARQPEARGQLMGIM**FI**GVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
S. aureus Newbould MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMF**IG**VGGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
S. aureus USA300_FPR3757 MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMF**IG**VGGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
S. epidermidis ATCC 12228 MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMF**IG**VGGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
S. pasteurii SP1 MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMF**IG**VGGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
S. warneri SGI MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMF**IG**VGGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
S. saprophyticus 15305 MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMF**IG**VGGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
S. haemolyticus JCSCL435 MGL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMSIMF**IG**IGLVEALPIIGVVIAFMTLFG 70
S. lugdunensis N920143 MGL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMSIMF**IG**IGLVEALPIIGVVIAFMTLFR 70
B. anthracis Ames MSLGVIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTIEGVARQPELKGALQTIMF**IG**IGLVEALPIIGVVIAFIVMNK 72
B. cereus ATCC 14579 MSLGVIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTIEGVARQPELKGALQTIMF**IG**IGLVEALPIIGVVIAFIVMNK 72
B. subtilis 6051-HGW MNL--IAAAIAIGLALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEAGKE**RT**LMFMGIALVEALPIIAVVIAFLAFFG 70
L. monocytogenes HCC23 MSLGVIAAAIAVGLGALGAGIGNGLIVSKTVEGVARQPEARSM**Q**IMF**IG**IGLVEALPIIAVVIAFIVMNK 72
L. ivanovii PAM 55 MSLGVIAAAIAVGLGALGAGIGNGLIVSKTVEGVARQPEARSM**Q**IMF**IG**IGLVEALPIIAVVIAFIVMNK 72
B. coagulans 36D1 MSLGILIAAAIAVGLAALGAGIGNGLIVGRTEGVARQPEARGL**Q**TMF**IG**IGLVEALPIIAVVIAFIALGR 72

Bacillales consensus sequence LXXXAAAIAXGLXALGAGIGNGLIVXX**X**EGXARQPEXXXX**XXX**MX**XXX**LVEALPIIXVVIAF

Non-target species vs. *S. aureus*

S. aureus NCTC 8325 MNL-----IAAAIAIG---LSALG**AG**IGNGLIV**SRT**VEGVARQPEARGQLMGIM**FI**GVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 72
S. pneumoniae MNL-----TFLGLC---IACM**V**SVCEGL**LM**NGLFKS**VAR**Q**DM**LSEFRSL**MF**LGVAFI**EG**TF**FF**VT**IA**FS**EI**IK-- 66
E. coli MENLNMDLLY-----MAAA**V**MMG---LAAIGAAIGIGILGGKFL**GA**ARQ**DL**IPL**RT**Q**FF**I**VM**GLVD**AI**FM**IA**GLGLYVMFAVA--- 79
M. smegmatis -----MDLDPNAIITAGALIGGG**L**IMG---GGAI**G**AGIGD**GI**AGNALIS**GI**ARQ**PE**AQGR**FT**PF**FI**TVGLVE**AY**FI**IN**LAFMALFVFATPGLQ 86
M. tuberculosis -----MDP--TIAAGALIGGG**L**IMA---GGAI**G**AGIGD**GV**AGNALIS**GV**ARQ**PE**AQGR**FT**PF**FI**TVGLVE**AY**FI**IN**LAFMALFVFATPVK- 81
Homo sapiens LQVARREFQTSVVS**R**DIDTA**K**FI**G**AGAA**T**VGVA**SS**AGIS**T**VF**GS**LI**IG**Y**ARN**SLK**Q**LF**SY**AIL**GF**AL**SE**AMGL**FC**LM**VA**FL**IL**FAM---136

Mutations providing resistance

SaR1 S
 SaR2-R3-R4 L
 SaR5 C
 SaR6 L
 MyR V D P M
 A
 G

Figure 2. Amino acid sequence alignments of the ATP synthase subunit C for selected species.

First, the alignments for several species of *Bacillales* present a consensus sequence, highlighted in green. Amino acids additionally identical to those of *S. aureus* are highlighted in yellow. Amino acids mutated in TO/FC04-100-resistant mutants are in red and bold characters in the *S. aureus* NCTC 8325 sequence. Also shown below the *Bacillales* consensus sequence are the alignments for some bacterial species not targeted by TO. The changes in amino acids found in TO/FC04-100-resistant *S. aureus*

(SaR1 to SaR6) are indicated below the alignments. The essential ion-binding glutamate (aspartate in *E. coli*) is indicated in bold black. Changes in amino acids reported for the bedaquiline-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium smegmatis* (MyR denotes a mixture of these two species) are also indicated below the alignments (40).

Additionally, using Blastp, and a comparison to the reference strain *S. aureus* NCTC 8325, we found that AtpE sequences are highly similar with 100% identity for most of the *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pasteurii* and *S. warneri*), 96% for *S. saprophyticus*, 94% for two other coagulase-negative staphylococci (*S. haemolyticus* and *S. lugdunensis*), 83% for pathogenic bacilli (*B. anthracis* and *B. cereus*). The lowest identity was found to be 75 - 79% for *B. subtilis*, *B. coagulans* and *Listeria* spp. (*L. monocytogenes* and *L. ivanovii*). The exception was *B. pseudofirmus*, which shared only 52% identity (data not shown). Additionally, comparison of >1000 strains of *S. aureus* and *S. epidermidis* using Blastp revealed 100% identity in their ATP synthase subunit C amino acid sequence (data not shown). Interestingly, amino acids found to be mutated in high-level TO/FcM-resistant *S. aureus* mutants were conserved in all *Bacillales*, except S26 in *B. coagulans* (Fig 2). Some sequences conserved around those amino acids (green boxes in Fig 2) are not conserved in non-target species (e.g., *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium* spp., *Homo sapiens*), as shown in Fig 2. The conserved consensus sequence for *Bacillales* (*B. pseudofirmus* not included) is LXXXAAAIAXGLXALGAGIGNGLIVXXTXEGXARQPEXXXLXXXMFXGXXLVEALPIIXVVI AF. Blast analysis of that consensus sequence identified all *Bacillales*. This consensus sequence where mutations associated with high-level resistance to TO and its analog are found could explain the specificity of the antibacterial activity of these drugs for *Bacillales* and may point out to the interaction site(s) between these molecules and subunit C.

In contrast, non-target species presented low identity for the AtpE sequence in comparison with that of *S. aureus* NCTC 8325. The highest similarity was found with *M. tuberculosis* having only 55% identity, while the lowest was with *S. pneumoniae* (31%). There was no significant identity match with the human sequence (Fig 2). Again, the absence of the *Bacillales* conserved consensus sequence in the non-target species may explain the absence of activity of TO against these species. Bedaquiline, now approved for the treatment of *Mycobacterium tuberculosis* infections (39), is an ATP synthase subunit C inhibitor specific to *Mycobacterium* (10). Also shown in Fig 2 for comparison, are mutation sites (not all presented here) in *Mycobacterium* isolates which provide resistance to bedaquiline (40). Interestingly, similar to the role of mutations in TO resistance, any of these distinct mutations in *Mycobacterium* can provide resistance to bedaquiline (see MyR amino acid changes illustrated in Fig. 2 compared to the SaR mutations recorded in the present study).

2.2.3.5. Genetic manipulation of *atpE*

Since the target species of TO (i.e., the *Bacillales*) share a consensus sequence in the AtpE protein (green boxes in Fig 2), we performed genetic manipulations in *S. aureus* and *B. subtilis* to validate the role of AtpE in TO resistance. First, overexpression of the *atpE* gene in the TO- and FcM-susceptible *S. aureus* $\Delta hemB$ background provided resistance to these agents up to the level seen in the non-SCV strain Newbould (Table 2, see Newbould $\Delta hemB$ +*atpE* vs. empty vector control). This further suggests that TO and FcM share a common target, and that overexpression of that target reverses susceptibility of *S. aureus* $\Delta hemB$.

Tableau 2. Susceptibility profile of genetically manipulated *S. aureus* and *B. subtilis* strains.

Strains	MIC (µg/mL)		
	TO	FcM	TO(+HQNO)*
<i>S. aureus</i> Newbould	>64	2	0.12
<i>S. aureus</i> Newbould Δ <i>hemB</i> empty vector	0.06	0.06	0.06
<i>S. aureus</i> Newbould Δ <i>hemB</i> + <i>atpE</i>	>64	8	nd
<i>S. aureus</i> Newbould Δ <i>hemB</i> SaR5	>64	2	>64
<i>B. subtilis</i> 168	>64	nd	0.12
<i>B. subtilis</i> 168 with SaR5 <i>atpE</i> mutation	>64	nd	>64

TO, tomatidine; FcM, FC04-100 major stereoisomer; nd, not determined. The ">" sign denotes the highest concentration tested.

* HQNO was added at a fixed concentration of 10 µg/mL during the susceptibility test.

Furthermore, introducing the mutation found in the *atpE* gene of one of the high-level TO-resistant *S. aureus* mutant (e.g., SaR5) in the *Bacillus atpE* gene provided a resistance to TO mixed with the electron transport chain inhibitor HQNO (Table 2). Indeed, we used HQNO to reveal the resistance phenotype in the non-SCV strain *B. subtilis* 168. We have shown before that wild type *S. aureus* strains exposed to HQNO behave like SCVs and become hypersensitive to TO (12). Here, we show that *B. subtilis*, possessing the mutation of *S. aureus* SaR5 in *atpE*, remains resistant to TO in

the presence of HQNO (MIC >64 µg/mL), as opposed to that seen with *B. subtilis* carrying the wild type *atpE* sequence (MIC 0.12 µg/mL). This shows that the sole transfer of the SaR5 mutation from *S. aureus* to *B. subtilis* provides TO resistance.

2.2.3.6. ATP synthase subunit C model

The impact of the *S. aureus* mutations was investigated by building a model structure of the monomeric subunit C of strain Newbould Δ *hemB* and of a dodecameric assembly of subunit C using SWISS-MODEL (41), built on homology with PDB 3ZO6 and PDB 1WU0. Fig 3A shows the positions of the four amino acids mutated in TO/FcM-resistant isolates (Fig S2; Ala17, Gly18, Ser26 and Phe47). Each of these amino acids is a putative binding/interaction site for TO and/or its analog and is near the essential ion-binding site amino acid Glu54, suggesting that compound binding could interfere with the function of amino acid Glu54. Fig 3B to 3E show the configuration of the mutated amino acids, which are all individually associated with high-level resistance. It can be hypothesized that each mutated amino acid affects TO/FcM binding or interaction with the ATP synthase subunit C, or allows proton transfer even if TO/FcM is bound. Fig 3F and 3G present the dodecameric assembly of subunit C of non-resistant strain and Fig 3-5K present mutated amino acids Ser17 (SaR1), Cys18 (SaR5), Leu26 (SaR2, R3, R4) and Leu47 (SaR6) in the dodecameric assembly, respectively. Amino acid Leu26, in comparison to Ser26, clearly appears exposed at the surface of the subunit C in the internal portion of the assembly and Leu47, in comparison to Phe47, appears exposed in the external portion. On the other hand, Ser17 and Cys18 are located between the subunits, which may affect assembly integrity although Ser17 in mutant SaR1 had the lowest impact on the multimeric model.

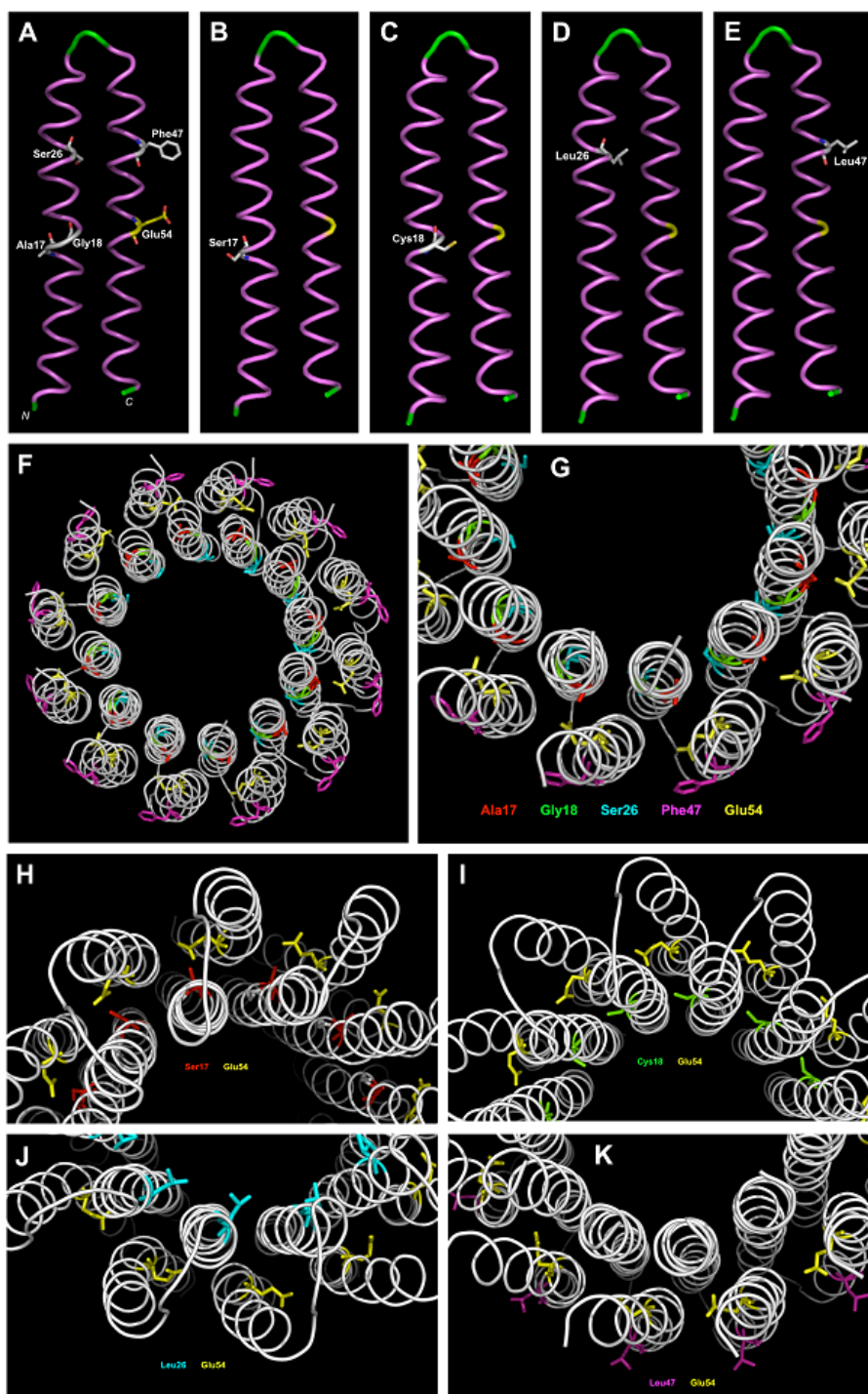


Figure 3. Monomeric and multimeric models of ATP synthase subunit C built, respectively, on homology with templates of PDB accession numbers 1WU0 and 3ZO6, using the SWISS-MODEL server.

(A) Position of amino acids (in white) implicated in high-level TO resistance in the wild-type polypeptide. Essential amino acid Glu54 is in yellow. (B) Position of Ser17 mutation in SaR1. (C) Position of Cys18 mutation in SaR5. (D) Position of Leu26 mutation in SaR2, SaR3, and SaR4. (E) Position of Leu47 mutation in SaR6. (F) Overview of the multimeric assembly of ATP synthase subunit C. (G) Position of amino acids (Ala17, red; Gly18, green; Ser26, cyan; Phe47, magenta) implicated in resistance in the wild-type multimeric assembly. Glu54 is also shown in yellow. (H) Position of the Ser17 mutation in the multimeric assembly in SaR1. (I) Position of the Cys18 mutation in the multimeric assembly in SaR5. (J) Position of the Leu26 mutation in the multimeric assembly in SaR2, SaR3, and SaR4. (K) Position of the Leu47 mutation in the multimeric assembly in SaR6. The models were drawn using PYMOL software (version 1.8.7.0; DeLano Scientific, San Francisco, CA).

2.2.3.7. Inhibition of ATP synthesis in prototypic and SCV strains

Following genomic investigation, we hypothesized that TO and FC04-100 would target the C subunit of the ATP synthase and predicted that those molecules would inhibit ATP synthesis by *S. aureus* Newbould Δ *hemB*. To test this hypothesis, we established an ATP synthesis assay using inverted membrane vesicles derived from either strain Newbould or its SCV counterpart. In this assay, the 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of known ATP synthase poisons (DCCD, CCCP and oligomycin) were similar to those reported in the scientific literature (9, 38) and ranged from 0.82 ± 0.17 μ g/mL to 8.67 ± 1.90 μ g/mL for membrane vesicles from *S. aureus* (prototypical or SCV strains), as well as for isolated mitochondria collected from pulmonary Calu-3 cells (Table 2).

As shown in Fig 4A (and in more details in Table 3), TO and FcM possess similar IC₅₀ for the *S. aureus* SCV ATP synthase (18.5 ± 1.9 and 18.9 ± 3.6 μ g/mL, respectively). Accordingly, less potent FC04-100 enantiomer (Fcm, MIC of 2 μ g/mL for the SCV

strain) demonstrated a higher IC₅₀ in the assay ($47.0 \pm 9.6 \mu\text{g/mL}$). Other TO analogs with low or no antibiotic activity were also tested as additional comparators in the assay. Hence, the 3 α -hydroxyl enantiomer of TO, FC02-190 (TO is 3 β), which possesses weaker antibacterial activity against *S. aureus* SCV (MIC of $8 \mu\text{g/mL}$), possessed a higher IC₅₀ ($85.1 \pm 7.0 \mu\text{g/mL}$). Furthermore, no MIC ($>128 \mu\text{g/mL}$) or inhibition of ATP synthesis was observed (IC₅₀ $>1024 \mu\text{g/mL}$) for a TO analog possessing an open spiroaminoketal moiety, FC04-116 (Fig 4A). A correlation between structure, MIC and IC₅₀ thus emerges for the *S. aureus* SCV (Fig 4C), demonstrating that simply having a steroidal backbone is not sufficient to inhibit ATP synthesis. The orientation of position 3 group and an intact spiroaminoketal moiety in TO and analogs are important for ATP synthase inhibition and whole-cell inhibitory activity (MIC). Also noteworthy, tomatine (the 3 β -glycosylated form of TO), which is devoid of inhibitory activity against *S. aureus* SCVs (12), does not inhibit ATP production in this assay (Table 3), showing that extensive modification of the 3 β -hydroxyl group of TO is deleterious for both antibacterial effect against whole bacterial cells as well as isolated membrane vesicles. Other structurally unrelated antibiotics had no inhibitory ability against staphylococcal ATP synthase (e.g., levofloxacin [a fluoroquinolone] or gentamicin [an aminoglycoside antibiotic], Table 3), including bedaquiline (a diarylquinoline), a specific inhibitor of the *Mycobacterium* ATP synthase also targeting subunit C (IC₅₀ $>1028 \mu\text{g/mL}$, Fig 4A and Table 3). This reinforces the idea that bacterial ATP synthases are sufficiently distinct from each other to respond to specific inhibitors, as suggested by the analysis of their amino acid sequences (Fig 2). Similarly, neither bedaquiline (9) nor TO and analogs (Table 3 and Fig 4C) display any inhibitory activity on ATP production by mitochondria, an important feature for ultimate use in higher species. Extrapolation of IC₅₀ data points for mitochondria (Table 3) suggests a selectivity index (SI: IC₅₀

mitochondria/IC₅₀ bacterial ATP synthase) >105 for TO analogs. In contrast, typical ATP synthase inhibitors, such as DCCD and oligomycin, are nonselective SI ≤1).

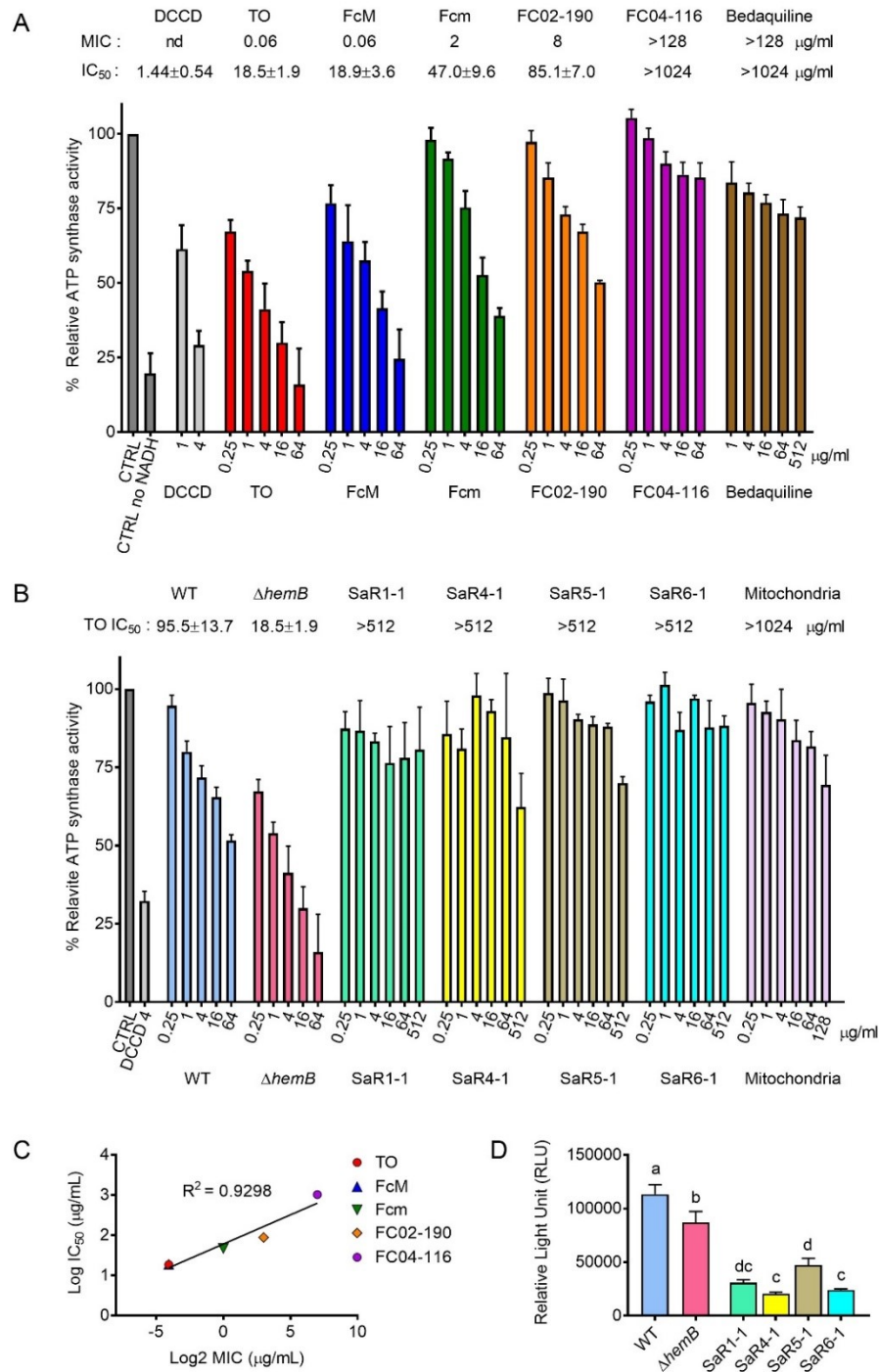


Figure 4. Effect of TO and analogs on the ATP synthase activity of *S. aureus*.

The control (CTRL) represents the maximal ATP production in the absence of ATP synthase inhibitor whereas the assay performed without addition of NADH represents the minimal value. nd, not determined. (A) Relative ATP synthase activity of the SCV *ΔhemB* strain in the presence of various inhibitors (B) Relative ATP synthase activity of the SCV *ΔhemB atpE* mutants (SaR1, SaR4, SaR5, and SaR6) in the presence of TO. The effects of TO on the parental *ΔhemB* strain and the prototypical strain Newbould (WT) and on human mitochondria are also shown for comparison. (C) Correlation between TO and analogs (FcM, Fcm, FC02-190, and FC04-116). Log₂ MICs and the log₁₀ IC₅₀s were determined in the ATP synthase assay using *S. aureusΔhemB* membrane vesicles. (D) ATP production (relative light units, RLU) by membrane vesicles prepared from the SCV *ΔhemB atpE* mutants. ATP production by the parental *ΔhemB* strain and the prototypical strain Newbould (WT) is also shown. In panel D, letters shared between or among the groups indicate no significant difference.

Additionally, we investigated wild type *S. aureus* membrane vesicles to examine the influence of a fully functional respiratory chain on TO and TO analogs activities. Similarly, we used wild type *E. coli* membrane vesicles as a comparator. It shows that even though TO does not possess noticeable antibacterial activity against either wild type *S. aureus* or *E. coli*, some inhibition of ATP synthesis is observed in this cell-free assay. The IC₅₀ of TO was however much higher and demonstrated 5 - 14 times less inhibitory activity in the ATP synthesis assay against wild type *S. aureus* and *E. coli*, respectively, than *S. aureus* SCVs. The most active TO analog was FcM, with MIC 2 µg/mL and IC₅₀ 40.2 ± 13.8 µg/mL against wild type *S. aureus* Newbould and a MIC of 32 µg/mL (IC₅₀ 102.4 ± 16.6 µg/mL) against *E. coli* (Table 3).

Tableau 3. MIC ($\mu\text{g/mL}$) and inhibition of ATP synthesis (IC_{50} in $\mu\text{g/mL}$) by TO, TO analogs and reference compounds for different bacterial strains and mitochondria.

Compound	<i>$\Delta hemB$</i>		Newbould		<i>E. coli</i>		Mitochondria
	MIC ^{ab}	IC ₅₀ ^a	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	IC ₅₀
TO	0.06	18.5 \pm 1.9	>128	95.5 \pm 13.7	>128	264.73 \pm 30.8	>1024
FcM	0.06	18.9 \pm 3.6	2	40.2 \pm 13.8	32	102.42 \pm 16.6	>1024
Fcm	2	47.0 \pm 9.6	8	111.0 \pm 11.3	64	223.09 \pm 45.9	>1024
FC02-190	8	85.1 \pm 7.0	>128	>1024	>128	>1024	>1024
FC04-116	>128	>1024	>128	>1024	>128	>1024	>1024
DCCD	nd	1.44 \pm 0.54	nd	1.32 \pm 0.32	nd	1.62 \pm 0.54	0.82 \pm 0.17
CCCP	nd	1.46 \pm 0.27	nd	6.11 \pm 1.1	nd	2.80 \pm 1.01	7.19 \pm 2.23
Oligomycin	nd	8.67 \pm 1.9	nd	9.41 \pm 1.5	nd	5.63 \pm 1.23	5.91 \pm 0.82
Tomatine	>128	>1024	>128	>1024	>128	>1024	>1024
Bedaquiline	>128	>1024	>128	>1024	>128	>1024	>128
Gentamicin	8	>1024	0.25	>1024	1	>1024	>1024
Levofloxacin	0.25	>1024	0.25	>1024	0.03	>1024	>1024

^aThe ">" sign denotes the highest concentration tested; ^bnd, not determined.

2.2.3.8. ATP synthesis by *S. aureus* SCV mutants

Next, we investigated whether mutations resulting in TO resistance had an impact on ATP synthesis. As expected because of its impaired respiratory chain, Fig 4D shows that ATP production by the SCV *$\Delta hemB$* strain in the membrane vesicle assay was significantly reduced compared to that produced by the prototypic strain Newbould. Interestingly, the ATP production by the mutants SaR1, SaR4, SaR5 and SaR6 (previously described in Fig S2) was further reduced compared to that of the *$\Delta hemB$*

parental strain (Fig 4). These results indicate that the mutations in *atpE* leading to high-level TO resistance further impair the ability of the SCV $\Delta hemB$ to produce ATP.

As mentioned earlier, the MIC of TO increased from 0.06 $\mu\text{g/ml}$ to $>64 \mu\text{g/ml}$ for the high-level resistant mutants (Table 1). As expected for an altered drug target, the IC₅₀ of TO, its 3 α -hydroxyl analog (FC02-190) and Fcm increased drastically using the mutants inverted membrane vesicles in this assay (IC₅₀ $>512 \mu\text{g/mL}$ against all mutants, Fig. 6C and Table 4). Overall, the mutations in the AtpE subunit clearly had an impact on the resistance of whole cells and tolerance to ATP synthesis inhibition in the membrane vesicle assay. However, FcM, which possesses a residual MIC of 2 $\mu\text{g/mL}$ against all mutants (initial MIC of 0.06 $\mu\text{g/mL}$ against parental strain $\Delta hemB$), also demonstrated some inhibitory activity in the ATP synthesis assay against SaR1 and SaR5, with an IC₅₀ of 238 and 110 $\mu\text{g/ml}$, respectively. SaR1 and SaR5 were the most fit mutants in terms of ATP production (Fig 4D). Interestingly, the multimeric model of subunit C (Fig 3) showed that in contrast to the mutations in SaR1 (Ala17Ser) and SaR5 (Gly18Cys), mutations in SaR4 (Ser26Leu; identical to SaR2 and SaR3) and R6 (Phe47Leu) were those protruding from the internal or external portion of the assembly, respectively, possibly better preventing binding of TO and analogs to the multimeric structure of subunit C and further reducing ATP production (Fig 4D).

Tableau 4. MIC ($\mu\text{g/mL}$) and selective inhibition of ATP synthesis (IC_{50} in $\mu\text{g/mL}$) by TO and TO analogs for different TO-resistant mutants.

Compounds	SaR1-1		SaR4-1		SaR5-1		SaR6-1	
	MIC ^a	IC ₅₀ ^a	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀
TO	>64	>512	>64	>512	>64	>512	>64	>512
FC02-190	>64	>512	>64	>512	>64	>512	>64	>512
FcM	2	238 \pm 22.1	2	>512	2	110 \pm 9.8	2	>512
Fcm	8	>512	8	>512	8	>512	8	>512

^aThe ">" sign denotes the highest concentration tested.

2.2.4. DISCUSSION

The phytoanticipin α -tomatine, a sterol glycol-alkaloid, possesses antifungal activity and protects solanaceous plants against phytopathogens (42). It was reported that α -tomatine disrupts eukaryote cell membranes by forming complexes with ergosterol and cholesterol (42, 43). On the other hand, TO, the aglycon version of α -tomatine, loses inhibitory activity against most phytopathogens (42) and does not possess sterol binding activity (43). In *Saccharomyces cerevisiae* and several protozoans, however, it was reported that TO perturbs ergosterol biosynthesis by targeting Erg6 (C-24 sterol methyltransferase) but also of Erg4 (C-24 sterol reductase), two enzymes absent in mammals and most bacteria (44–47). Such findings in fungi and protozoans suggest a different mode of action for the potent and specific antibacterial activity of TO against SCVs of the Bacillales (13). Noteworthy, TO activity is equivalent for SCVs that are auxotrophs for either hemin or menadione (12, 13), or even thymidine (unpublished). This suggests that TO targets a common weakness among SCVs. In the present study, we examined the genomes of in vitro-generated TO-resistant *S. aureus* SCVs to

identify mutations in genes associated with resistance, and identified the bacterial ATP synthase subunit C (coded by *atpE*) as their cellular target.

ATP synthase is an ubiquitous enzyme that utilizes energy stored in the transmembrane electrochemical gradient to synthesize ATP (48). However, it essentially differs across species (49, 50). Little is known about the *S. aureus* ATP synthase, however it was shown to be important for growth and survival (38, 51), reinforcing the hypothesis that mutations in *atpE* need to allow some level of functionality. For other *Bacillales* like *L. monocytogenes*, it was reported that ATP synthase also plays a role in pH homeostasis (52), and that deletion of ATP synthase in *B. subtilis* greatly affects growth (53). Our previous work showed that TO and its analog FC04-100 possess a narrow yet specific spectrum of activity against the SCVs of *Bacillales* (13). We show herein that specificity could be explained by the presence of conserved amino acid sequences in the ATP synthase subunit C across species of the *Bacillales* order. This also indicates that the cellular function(s) of ATP synthase is of primary importance for survival in *Bacillales*, at least in the SCV background which possesses an altered respiratory chain. Previous studies revealed that extensive metabolic remodeling occurs in persistent bacteria such as SCVs (54–56), during sporulation in *Bacillus* spp (57), and in slow-growing bacteria and biofilm-producing bacteria (33, 58, 59). It has been hypothesized that targeting energy metabolism is of interest for the development of antibiotics (60). Also, Balemans et al. (38) showed that targeting the Gram-positive ATP synthase is a possible approach toward the discovery of new antibacterial agents.

The subunit C of bacterial ATP synthase is a clinically validated antimicrobial target since the novel antibiotic bedaquiline, which targets subunit C of the ATP synthase of *M. tuberculosis*, was recently approved for the treatment of tuberculosis (10, 39). Hards et al. (61) proposed that bedaquiline binds to subunit C and perturbs the interface

between subunits A and C, leading to a dysfunctional proton cycle that stops ATP synthase function. In order to allow the translocation of protons, subunits A and C must move relative to each other. The proton transfer chain, elucidated in *E. coli* (62) and in *M. tuberculosis* (63), possesses two conserved amino acids of interest: Glu61 of subunit C in *M. tuberculosis* (Asp61 in *E. coli* and Glu54 in *S. aureus*) that transfers the proton it receives to R186 of subunit A (R210 in *E. coli* and presumably R174 in *S. aureus*). Further functional assays and structural models showed that bedaquiline interacts with the ATP synthase subunit C by several means and covers the c-rotor ion-binding site, preventing the proton cycle and ATP synthase activity (64). The ATP synthase subunit C model presented in Fig 3 indicates the position of mutated amino acids that give high-level resistance to TO and some degree of resistance to its analog FcM. It also represents putative binding/interaction sites that could impact the nearby essential Glu54 amino acid. TO could also interact with the essential glutamate, similarly to the mechanism of action of bedaquiline. In that case, similarly to bedaquiline (40, 65), any of the mutated amino acids found in TO-resistant strains could modify the structure of ATP synthase subunit C in a manner that prevents TO binding or proton transfer even in presence of bound TO. Models of the ATP synthase subunit C (Fig 3) also showed that two of the four identified mutations leading to high-level TO resistance (SaR2, R3, R4: Ser26Leu; and SaR6: Phe47Leu) showed protruding amino acids internal or external to the assembly, whereas the other two mutated amino acids reside between the subunits (SaR1: Ala17Ser; SaR5: Gly18Cys), while sustaining a higher level of ATP production and keeping some degree of sensitivity to FcM (i.e., measurable IC50) compared to that seen with SaR4 and SaR6. It is possible that mutations in SaR4 and SaR6 block binding of the inhibitors, whereas those in SaR1 and SaR5 compensate to allow better proton translocation despite binding. Further structural studies are required to elucidate the resistance mechanism.

The proton-motive force is the weakness of SCVs (28). The proton-motive force normally generated by a strong electron transport chain is used by the bacterial ATP

synthase to generate ATP (66). Interestingly here, all low-level TO-resistant SCVs showed a mutation in the *ccpA* gene (which encodes the catabolite control protein A), and this mutation is conserved in sequential clones possessing high-level resistance to TO with further mutation in *atpE*. CcpA is a highly conserved carbon catabolite regulator in low-GC Gram-positive bacteria, and has been intensively studied in *B. subtilis* (67–69), *S. xylosus* (70) and *S. aureus* (71, 72). It functions as a catabolite activator or repressor, that allows bacteria to use preferential carbon sources over secondary carbon sources, as in the presence of glucose. CcpA can also enhance glycolysis and inhibit the tricarboxylic acid (TCA) cycle. As such, a mutation in *ccpA* would be expected to affect the formation of substrates for the respiratory chain, and consequently the proton gradient, and could potentially moderately compensate for the consequences of the ATP synthase inhibition by TO.

The ability of TO and semi-synthetic derivatives to target *S. aureus* SCVs may lead to important clinical applications. Indeed, it is well-known that cystic fibrosis (CF) patients are highly susceptible to colonization by this bacterial phenotype. Indeed, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* very often co-colonize the lungs of CF patients (73), and it was previously demonstrated that the *P. aeruginosa* exoproduct 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide promotes the emergence of *S. aureus* SCVs, and also increases biofilm formation by prototypical *S. aureus* (31). Consequently, *S. aureus* SCVs have been independently associated with worsening lung disease in CF children (27). Since CF patients are often subjected to inhaled aminoglycoside (tobramycin) therapy to control *P. aeruginosa* infections, a combination treatment with steroidal alkaloids such as TO or FC04-100 appears attractive to tackle all three pathogens: *P. aeruginosa* (with the aminoglycoside), prototypical *S. aureus* (with the synergy of the aminoglycoside and steroidal alkaloid (11, 13)), and its SCV phenotype (with the steroidal alkaloid). An analog of TO such as FC04-100 that also possesses activity against prototypic *S. aureus* strains would certainly be advantageous, especially since it keeps high selectivity against the bacterial ATP

synthase with a SI of at least 105 (inhibition of ATP production by mitochondria vs. bacterial ATP synthase).

Here, we show that TO possesses good affinity for the ATP synthase of both prototypic and SCV inverted membrane vesicles, but that the relationship between IC₅₀ and whole-cell activity (MIC) only correlates well in SCVs. This may suggest an alternate mode of action for FC04-100 or more specifically FcM, which shows activity against prototypical *S. aureus* (MIC 2 µg/mL), in contrast to TO which has no activity despite a good IC₅₀ for the prototypical ATP synthase. However, the simplest explanation could reside in the physical properties of this TO analog. FC04-100 is positively charged and less hydrophobic and more soluble than TO, which may allow FC04-100 to reach its target in prototypical cells knowing that the surface properties of SCVs and prototypical cells are indeed quite different (28). Also noteworthy, the major (FcM) and minor (Fcm) stereoisomers of FC04-100 studied here could not be clearly defined but FcM was more potent. This was consistent to previous observations which showed that TO, which possesses a 3β-hydroxyl group, is much more potent than its 3α isomer (i.e., FC02-190) (37).

Overall, this study allowed to identify ATP synthase subunit C as the bacterial cellular target for TO and its analog FC04-100. Specificity of antibacterial activity for *Bacillales* appears to be explained by the presence of conserved motif sequences in their ATP synthase subunit C. FC04-100 is a possible candidate for the development of this class of antibiotics, since resistance development is more difficult, and its potency is increased against prototypic *Bacillales* strains.

2.2.5 MATERIALS and METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *S. aureus* strains Newbould (ATCC 29740) and Newman were used as representatives of the normal phenotype. The *S. aureus* strain Newbould Δ *hemB* (Δ *hemB*) was used as the SCV counterpart. This SCV strain Δ *hemB* was generated from strain Newbould by disrupting the *hemB* gene with the *ermA* cassette by homologous recombination (74). Normal phenotype *S. aureus* strains were grown in 4-L flasks at 225 rpm 1 L cation adjusted Mueller Hinton Broth at 35°C (CAMHB; BD, Mississauga, ON, Canada). Except where otherwise stated, Δ *hemB* and SCV mutant derivatives were grown in 4-L flasks at 225 rpm 1 L Brain Heart Infusion (BHI; BD, Mississauga, ON, Canada) at 35°C. The *Escherichia coli* strain ATCC 25922 was also used for preparation of inverted membrane vesicles (see below).

Chemical reagents and antibiotics. Tomatidine hydrochloride (TO) was purchased from Molekula (Shaftesbury, Dorset, United Kingdom) or Onbio (Richmond Hill, ON, Canada) and gentamicin was from Sigma (Oakville, ON, Canada). TO and FC04-100 (mixed stereoisomers at position 3, Fig 1) were solubilized at 2 mg/mL in DMSO. Gentamicin was solubilized at 10 mg/mL in water. Synthesis of FC04-100 was performed as previously described (37). The two diastereoisomers of FC04-100 (one major [FcM] and one minor [Fcm]) were separated by reverse-phase chromatography using a Waters preparative LC (Sample Manager 2767, Fraction collector), a binary gradient module 2545 with two 515 HPLC pumps and a system Fluidics Organizerescription SFO and a Photodiode Array Detector 2998 (column X Select CSH Prep C18 5 μ m OBD 19 x 250 mm² column, buffer A: 0.1% HCOOH in H₂O, buffer B: 0.1% HCOOH in ACN, flow 20 mL/min). Although separation of the two epimers of FC04-100 was successful, their unambiguous structural assignment remained elusive to this day, including the production of crystals for X-ray crystallography. Mass spectrometry spectra were recorded on a Waters SQ Detector 2 (electrospray) instrument (Mississauga, ON, Canada).

Antibiotic susceptibility testing. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of drugs yielding no visible bacterial growth were determined by a broth microdilution technique by following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (75), except that the incubation period was extended to 48 h and the medium used was BHI for SCV strains. In some experiments, the MIC of TO was determined in presence of the electron transport inhibitor 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HQNO; Axxora, San Diego, CA). HQNO was solubilized in DMSO at a concentration of 5 mg/mL and used at a fixed concentration of 10 µg/mL.

Generation of TO-resistant mutants and FC04-100-resistant mutants. The generation of TO-resistant mutants was elicited by serial passage of *S. aureus* strain Newbould Δ *hemB* (30 passages of 48 h each) in a series of two-fold dilutions of TO (range: 0.06 to 64 µg/mL in BHI) in 96-well plates. At each passage, the MIC was determined and the well representing 0.5xMIC was diluted in fresh broth and used to inoculate (~10⁶ CFU/mL) a new series of TO dilutions for the next passage. At each passage, the 0.5xMIC well was also plated on BHI agar (BHIA) and the next day, three isolates were collected and frozen. Intermediate TO-resistant mutants were this way isolated from passages 7, 11 and 20. Following 30 passages, three isolates from the highest TO concentration tested (64 µg/mL) were purified on BHIA supplemented with 32 µg/mL of TO. Such passages and isolate selection were repeated twice and also an additional time starting from an intermediate TO-resistant isolate initially selected on passage 7.

The generation of FC04-100-resistant mutants was similarly provoked by serial passage of strain Newbould Δ *hemB* on a series of two-fold dilutions of FC04-100 (range: 0.06 to 64 µg/mL in both BHI) in 96-well plates. Three isolates growing at the highest concentration reached after 30 passages (4 µg/mL) were purified on BHIA supplemented with 4 µg/mL of FC04-100 (mixture of the stereoisomers).

The generation of non-SCV FC04-100-resistant mutants was also attempted by serial passage of the prototypic strain Newman on a series of two-fold dilutions of FC04-100 (range: 0.25 to 128 µg/mL in both BHI and CAMHB) in 96-well plates.

Spontaneous mutation frequency and mutant prevention concentration (MPC).

S. aureus Newbould Δ *hemB* from a 20-h agar plate was suspended in phosphate buffered saline 1x (PBS) to reach a 0.5 McFarland standard ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL). Ten mL of this suspension were added to 90 ml of BHI and incubated for 24 h at 35°C and 250 rpm. One hundred µL of the culture were plated on each of a series of BHIA plates containing increasing concentrations of TO or FcM. Controls with 8 µg/mL of rifampicin and with 3.2 % of DMSO (diluent for TO and FC-major) were also used. Tests were performed three independent times in triplicate. The mutation frequency was calculated by dividing the number of mutant colonies growing after 72h at 35°C by the initial CFU of the plated inoculum. The MPC was defined as the lowest concentration where no mutant colonies were observed three independent times and in each of the triplicate.

Whole-genome sequencing, assembly and annotation. Whole-genome shotgun libraries (three isolates per passage of interest) were prepared and sequenced using the Illumina Technology. Briefly, genomic DNA was extracted using the Qiagen QIAamp DNA mini kit and fragmented to a size of ~200-400 bp by treatment with the dsDNA Shearase enzyme (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. Libraries were then prepared according to Rodrigue et al. (76). Illumina sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2000 Sequencing system at the Plateau de Biologie Moléculaire et génomique fonctionnelle of the Institut de Recherche Cliniques de Montréal (Montreal, QC, Canada). Samples were multiplexed in a single sequencing lane and approximately 1 to 2 million paired-end reads of 50 bp were obtained for each library. The resulting reads were de novo assembled using the Roche

gsAssembler version 2.6. Contigs sequences were aligned and annotated using the reference genome of *S. aureus* strain Newman with ABACAS (77) and RATT (78). Four independently sequenced *S. aureus* Newbould Δ *hemB* genomes were first compared to the reference Newman genome to identify and eliminate inherent single nucleotide variants (SNVs) from the subsequent comparison of Newbould Δ *hemB* to resistant isolates. TO-resistant Newbould Δ *hemB* sequences were then compared against the parental SCV strain Newbould Δ *hemB* to identify SNVs associated to resistance.

PCR and Sanger sequencing. Mutations were confirmed by PCR amplification with specific primers to *S. aureus* targets genes. *atpE*-fwd 5'-TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC-3' and *atpE*-rev 5'-AGGTATCTGCTTCAATCAGCG-3' were used for *atpE* gene amplification. Two sets of primers were used for *ccpA* gene: *ccpA*deb-fwd 5'-CAAGCTTTTCGCTAAATTTTCC-3', *ccpA*deb-rev 5'-CGCCTTCTTTATAACTTTCAGC-3', *ccpA*fin-fwd 5'-ATGGTATTATTTTCCTTGGTGGT-3' and *ccpA*fin-rev 5'-GCGAGTTGGTACGAATCTAC-3'. Sanger sequencing was performed using capillary electrophoresis at Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Universitaire Laval (QC, Canada).

Overexpression of *AtpE* in Newbould Δ *hemB*. Plasmid pCN36 (79), in which the constitutive promoter PblaZ from pCN40 (79) was inserted in front of the multiple cloning site, was used to clone and express the ATP synthase subunit C *atpE* gene from *S. aureus* strain Newbould. Plasmid constructs were generated using *E. coli* DH5a (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), restriction enzymes (New England Biolabs [NEB] Inc., Pickering, ON, Canada) and the T4 DNA ligase (NEB). The recombinant plasmid purified from *E. coli* was then used to first transform *S. aureus* RN4220 (restriction-

defective) and the final host strain Newbould Δ *hemB* by electroporation (80). Plasmid constructs were validated by restriction digestion patterns and DNA sequencing.

Transfer of *S. aureus* *atpE* mutation and resistance to *B. subtilis*. To insert the mutation found in the *atpE* gene of *S. aureus* into *B. subtilis* strain 168, we used the plasmid pMiniMad2, which bears an erythromycin resistance marker and a temperature-sensitive origin of replication (a kind gift from D. Rudner, Harvard Medical School, Boston, MA) (81). First, the *atpE* gene from *B. subtilis* was amplified using the following primers : BS*atpE*-fwd 5'-GGTGCTATCCAGGCATTTATC-3' and BS*atpE*-rev 5'-TTGTCTCTTTTCAGCCGGCA-3', and the amplicon was cloned into pMiniMad2 with BamHI and EcoRI (New England Biolab). Then, using the QuickChange II XL site-directed mutagenesis tool (Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON, Canada) and according to the manufacturer instructions, we used oligonucleotides primers containing the mutation found in the *atpE* gene of one of the high-level TO-resistant *S. aureus* mutant (SaR5) to generate the sequence modification in the *B. subtilis* *atpE* gene before transforming XL-Gold Ultracompetent *Escherichia coli* cells (Agilent). The oligonucleotides primers used were: 5'-GGTTTAGGCGCACTTGGTGCATGTATTCGTAACGGTTTGATT-3' and 5'-CAATCAACCGTTACCAATACATGCACCAAGTGCGCCTAAACC-3'. The transformation of *B. subtilis* 168 with pMiniMad2 containing the mutated *atpE* gene was done using natural competence (82). The bacteria having integrated the plasmid were first selected at 40°C using the erythromycin resistance marker. Then, cells were grown at room temperature for 24 hours then grown for several passages in LB at 37°C without antibiotic to promote excision and loss of the plasmid. Bacteria that have lost the erythromycin resistance were then selected, genomic DNA was extracted (Qiagen genomic DNA extraction kit) and the *atpE* gene was amplified to confirm the position of the mutation by Sanger sequencing.

Preparation of inverted membrane vesicles. Bacterial cells were grown as described above to reach an A_{600nm} of ~0.6-0.8. Bacteria were harvested by centrifugation at 6,000 g for 10 min at 4°C, washed and suspended in a KPN buffer (20 mM potassium phosphate 140 mM NaCl [pH 7.5]). Cells of *S. aureus* were first treated with lysostaphin (400 µg/ml) for 1 h at 37°C, before addition of 3 µg/ml of a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich), deoxyribonuclease (6 µg/ml) and ribonuclease (6 µg/ml). After 30 min of treatment, cells were disrupted by a French pressure cell at 16,000 psi and the bacterial lysates were centrifuged at 6,000 g for 30 min at 4° C to remove unbroken cells. The supernatant was then centrifuged at 150,000 g for 40 min at 4° C using a fixed-angle rotor to collect the membranes. The membranes were suspended in a minimal volume of KPN buffer and stored at –80° C. Protein concentration was estimated by the Micro BCATM Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) using bovine serum albumin as a standard.

Measurement of ATP synthesis activity. The ATP synthesis activity was determined in isolated membrane vesicles from *S. aureus* by energizing them with NADH and quantifying the amount of ATP produced using the luciferin/luciferase system, similarly to the method described by Balemans et al. (38). Briefly, *S. aureus* membrane vesicles were diluted to a concentration of 50 µg protein/ml with 50 mM MOPS, pH 7.5 containing 10 mM MgCl₂. The membrane vesicles were pre-incubated with TO, FC04-100 or comparator molecules under stirring conditions at room temperature for 10 min. Subsequently 2.5 mM NADH (final conc.) was added and further incubated with vigorous shaking for 1 min. The reaction was started by addition of 1 mM ADP (final conc.) and 10 mM (final conc.) potassium phosphate. After 30 min, 400 µl of stop solution (2 mM EDTA, 1% trichloroacetic acid) was added in each reaction. 5 µl of this mixture was added to 100 µl of Tris-acetate buffer (100 mM Tris-HOAc, 2 mM EDTA, pH 7.75) in a 96 well plate. After addition of 50 µl of the luciferase reagent (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche), luminescence was measured with a luminometer (BMG labtech, Offenburg, Germany).

Isolation of human mitochondria. Inspired from Balemans et al. (38) with some modifications, the human lung cancer cell line Calu-3 ATCC HTB-55 (Manassas, Virginia, USA) was maintained in 75-cm² tissue culture flask in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% of an antibiotic-antimycotic solution (Wisent Inc, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada). Cell cultured were maintained at 37°C in 5% CO₂. To isolate mitochondria, Calu-3 cells in one 75-cm² tissue culture flask at 70% confluence were collected by centrifugation at 370 g for 10 min and then suspended in a 10-packed cell volume (1 mL) of NKM buffer (1 mM TrisHCl, pH 7.4, 0.13 M NaCl, 5 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂). This was repeated twice before cells were suspended in 6-packed cell volumes of homogenization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 6.7, 10 mM KCl, 0.15 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, and 1 mM DTT, with the latter two components immediately added before use). The cells were transferred to a glass homogenizer and incubated for 10 min on ice before homogenization with a tight pestle. The homogenate was poured into a conical centrifuge tube containing 1-packed cell volume of a 2 M sucrose solution and mixed gently. Unbroken cells, nuclei, and large debris were removed by centrifugation at 1,200 g for 5 min and the supernatant was transferred to another tube. This process was repeated twice, transferring the supernatant to a new tube each time and discarding the pellet. The mitochondria were finally collected by centrifuging at 7,000 g for 10 min and suspended in a 3-packed cell volume of mitochondrial suspension buffer (10 mM TrisHCl, pH 6.7, 0.15 mM MgCl₂, 0.25 M sucrose, 1 mM PMSF, 1 mM DTT). Mitochondria were collected again by centrifugation at 9,500 g for 5 min, kept at 4°C and used the same day in the mitochondrial ATP synthesis inhibition assay. Protein concentration was estimated by the Micro BCATM Protein Assay Kit.

Mitochondrial ATP synthesis inhibition assay. Inspired from Balemans et al. (38), human mitochondria (0.25 mg/mL) were incubated in 50 mM morpholino-

ethanesulfonic acid (MES; pH 6.5), 5mM MgCl₂, 20 mM KH₂PO₄, 100 µM P₁, P₅-di(adenosine-5) pentaphosphate (Ap₅A), 25 mM glucose. ATP production was then activated by adding the oxidative phosphorylation substrates ADP (67 µM) and succinate (5 mM). The resulting concentrations of ATP were determined by using the ATP Bioluminescence Assay Kit HS II and a microplate luminometer as described above for the bacterial membrane vesicle assay.

2.2.6 FUNDING INFORMATION

This study was supported by a basic research grant from Cystic Fibrosis Canada to FM and EM and by a team grant from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) to FM, KB and EM. This work was also supported by Discovery grant 89758-2010 from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to FM. MLB received studentships from NSERC and from FQRNT during this study. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

2.2.7. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Calcul Québec, Compute Canada and the Centre de Calcul Scientifique of the Université de Sherbrooke for access and technical support while using the Mammouth-mp2 supercomputer. We also thank Marie-Ève Lacombe-Harvey for visualization of the model structure of subunit C.

2.2.8 REFERENCES

1. Neill JO'. 2014. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Commissioned by the UK Prime Minister, 2014.
2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 48:1–12.

3. Coates ARM, Halls G, Hu Y. 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol* 163:184–94.
4. Chen I, Christie PJ, Dubnau D. 2005. The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria. *Science* (80-) 310:1456–1460.
5. Lupo A, Coyne S, Berendonk TU. 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front Microbiol* 3:18.
6. Perry JA, Wright GD. 2013. The antibiotic resistance “mobilome”: Searching for the link between environment and clinic. *Front Microbiol* 4:138.
7. Silver LL. 2011. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev* 24:71–109.
8. Mahajan R. 2013. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *Int J Appl basic Med Res* 3:1–2.
9. Haagsma AC, Abdillahi-Ibrahim R, Wagner MJ, Krab K, Vergauwen K, Guillemont J, Andries K, Lill H, Koul A, Bald D. 2009. Selectivity of TMC207 towards mycobacterial ATP synthase compared with that towards the eukaryotic homologue. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1290–2.
10. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HWH, Neefs J-M, Winkler H, Van Gestel J, Timmerman P, Zhu M, Lee E, Williams P, de Chaffoy D, Huitric E, Hoffner S, Cambau E, Truffot-Pernot C, Lounis N, Jarlier V. 2005. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 307:223–7.
11. Mitchell G, Lafrance M, Boulanger S, Séguin DL, Guay I, Gattuso M, Marsault É, Bouarab K, Malouin F. 2012. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. *J Antimicrob Chemother* 67:559–568.

12. Mitchell G, Gattuso M, Grondin G, Marsault É, Bouarab K, Malouin F. 2011. Tomatidine inhibits replication of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1937–45.
13. Guay I, Boulanger S, Isabelle C, Brouillette E, Chagnon F, Bouarab K, Marsault E, Malouin F. 2018. Tomatidine and analog FC04–100 possess bactericidal activities against *Listeria*, *Bacillus* and *Staphylococcus* spp. *BMC Pharmacol Toxicol* 19:7.
14. Otto M. 2012. Molecular insight into how MRSA is becoming increasingly dangerous. *Virulence* 3:521–3.
15. David MZ, Daum RS. 2010. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clin Microbiol Rev* 23:616–687.
16. Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease Antibiotic resistance threats in the United States. 2013 Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.
17. Leonard FC, Markey BK. 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J* 175:27–36.
18. García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RLR, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11:595–603.
19. Cuny C, Wieler L, Witte W. 2015. Livestock-Associated MRSA: The Impact on Humans. *Antibiotics* 4:521–543.
20. Sergelidis D, Angelidis AS. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food-borne pathogen. *Lett Appl Microbiol*.

21. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 14:584–640.
22. Bottone EJ. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev 23:382–98.
23. Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P, Stasiewicz MJ. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. J Food Prot 77:150–70.
24. Checinska A, Paszczynski A, Burbank M. 2015. *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. Annu Rev Food Sci Technol 6:351–69.
25. Beierlein JM, Anderson AC. 2011. New developments in vaccines, inhibitors of anthrax toxins, and antibiotic therapeutics for *Bacillus anthracis*. Curr Med Chem 18:5083–94.
26. Atalla H, Gyles C, Jacob CL, Moisan H, Malouin F, Mallard B. 2008. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. Foodborne Pathog Dis 5:785–99.
27. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin X, Cochrane E, Houston LS, Rogers GB, Marsh P, Prehar K, Pope CE, Blackledge M, Déziel E, Bruce KD, Ramsey BW, Gibson RL, Burns JL, Hoffman LR. 2013. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. Clin Infect Dis 57:384–391.
28. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol 4:295–305.

29. Kahl BC, Becker K, Löffler B. 2016. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. Clin Microbiol Rev 29:401–427.
30. Moisan H, Brouillette E, Jacob CL, Langlois-Begin P, Michaud S, Malouin F. 2006. Transcription of Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients Is Influenced by SigB. J Bacteriol 188:64–76.
31. Mitchell G, Séguin DL, Asselin A-E, Déziel E, Cantin AM, Frost EH, Michaud S, Malouin F. 2010. *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. BMC Microbiol 10:33.
32. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. 2009. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. J Med Microbiol 58:1067–73.
33. Mitchell G, Brouillette E, Séguin DL, Asselin A-E, Jacob CL, Malouin F. 2010. A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. Microb Pathog 48:18–27.
34. Sendi P, Proctor RA. 2009. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. Trends Microbiol 17:54–8.
35. Mitchell G, Grondin G, Bilodeau G, Cantin AM, Malouin F. 2011. Infection of polarized airway epithelial cells by normal and small-colony variant strains of *Staphylococcus aureus* is increased in cells with abnormal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and is influenced by NF-κB. Infect Immun 79:3541–51.
36. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Völker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, Löffler B. 2011. *Staphylococcus*

aureus phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. EMBO Mol Med 3:129–41.

37. Chagnon F, Guay I, Bonin M-A, Mitchell G, Bouarab K, Malouin F, Marsault É. 2014. Unraveling the structure–activity relationship of tomatidine, a steroid alkaloid with unique antibiotic properties against persistent forms of *Staphylococcus aureus*. Eur J Med Chem 80:605–620.

38. Balemans W, Vranckx L, Lounis N, Pop O, Guillemont J, Vergauwen K, Mol S, Gilissen R, Motte M, Lançois D, De Bolle M, Bonroy K, Lill H, Andries K, Bald D, Koul A. 2012. Novel antibiotics targeting respiratory ATP synthesis in gram-positive pathogenic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 56:4131–4139.

39. Cohen J. 2013. Infectious disease. Approval of novel TB drug celebrated--with restraint. Science 339:130.

40. Segala E, Sougakoff W, Nevejans-Chauffour A, Jarlier V, Petrella S. 2012. New mutations in the mycobacterial ATP synthase: new insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-ring structure. Antimicrob Agents Chemother 56:2326–34.

41. Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18:2714–23.

42. Sandrock RW, VanEtten HD. 1998. Fungal Sensitivity to and Enzymatic Degradation of the Phytoanticipin α -Tomatine. Phytopathology 88:137–143.

43. Roddick JG. 1979. Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols in vitro. Phytochemistry 18:1467–1470.

44. Dorsaz S, Snäka T, Favre-Godal Q, Maudens P, Boulens N, Furrer P, Ebrahimi SN, Hamburger M, Allémann E, Gindro K, Queiroz EF, Riezman H, Wolfender J-L, Sanglard D, Snäkä T, Favre-Godal Q, Maudens P, Boulens N, Furrer P, Ebrahimi SN, Hamburger M, Allémann E, Gindro K, Ferreira Queiroz E, Riezman H, Wolfender J-L,

Sanglard D. 2017. Identification and mode of action of a plant natural product targeting human fungal pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.00829-17.

45. Medina JM, Rodrigues JCF, De Souza W, Atella GC, Barrabin H. 2012. Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology* 139:1253–65.

46. Desmond E, Gribaldo S. 2009. Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. *Genome Biol Evol* 1:364–81.

47. Simons V, Morrissey JP, Latijnhouwers M, Csukai M, Cleaver A, Yarrow C, Osbourn A. 2006. Dual Effects of Plant Steroidal Alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2732–2740.

48. Capaldi RA, Aggeler R. 2002. Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci* 27:154–60.

49. von Ballmoos C, Cook GM, Dimroth P. 2008. Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu Rev Biophys* 37:43–64.

50. von Ballmoos C, Wiedenmann A, Dimroth P. 2009. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu Rev Biochem* 78:649–72.

51. Ko KS, Lee JY, Song JH, Baek JY, Oh WS, Chun JS, Yoon HS. 2006. Screening of Essential Genes in *Staphylococcus aureus* N315 Using Comparative Genomics and Allelic Replacement Mutagenesis. *J Microbiol Biotechnol*.

52. Cotter PD, Gahan CGM, Hill C. 2000. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response. *Int J Food Microbiol* 60:137–146.

53. Santana M, Ionescu MS, Vertes A, Longin R, Kunst F, Danchin A, Glaser P. 1994. *Bacillus subtilis* F0F1 ATPase: DNA sequence of the atp operon and characterization of atp mutants. J Bacteriol 176:6802–11.
54. Kriegeskorte A, König S, Sander G, Pirkl A, Mahabir E, Proctor RA, von Eiff C, Peters G, Becker K. 2011. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* reveal distinct protein profiles. Proteomics 11:2476–2490.
55. Seggewiss J, Becker K, Kotte O, Eisenacher M, Yazdi MRK, Fischer A, McNamara P, Al Laham N, Proctor R, Peters G, Heinemann M, von Eiff C. 2006. Reporter metabolite analysis of transcriptional profiles of a *Staphylococcus aureus* strain with normal phenotype and its isogenic *hemB* mutant displaying the small-colony-variant phenotype. J Bacteriol 188:7765–77.
56. Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. 2014. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. Front Cell Infect Microbiol 4:99.
57. Hoch JA. 1993. Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. Annu Rev Microbiol 47:441–65.
58. Lewis K. 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol 5:48–56.
59. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents 35:322–32.
60. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, Lee RE. 2011. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. Nat Rev Microbiol 9:62–75.
61. Hards K, Robson JR, Berney M, Shaw L, Bald D, Koul A, Andries K, Cook GM. 2015. Bactericidal mode of action of bedaquiline. J Antimicrob Chemother 70:2028–2037.

62. Girvin ME, Rastogi VK. 1999. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* 402:263–268.
63. de Jonge MR, Koymans LHM, Guillemont JEG, Koul A, Andries K. 2007. A computational model of the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* ATPase by a new drug candidate R207910. *Proteins* 67:971–80.
64. Preiss L, Langer JD, Yildiz Ö, Eckhardt-Strelau L, Guillemont JEG, Koul A, Meier T, Yildiz O, Eckhardt-Strelau L, Guillemont JEG, Koul A, Meier T. 2015. Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline. *Sci Adv* 1:e1500106.
65. Petrella S, Cambau E, Chauffour A, Andries K, Jarlier V, Sougakoff W. 2006. Genetic Basis for Natural and Acquired Resistance to the Diarylquinoline R207910 in *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2853–2856.
66. Hong S, Pedersen PL. 2008. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:590–641, Table of Contents.
67. Henkin TM. 1996. The role of the *CcpA* transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 135:9–15.
68. Tobisch S, Zühlke D, Bernhardt J, Stülke J, Hecker M. 1999. Role of *CcpA* in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181:6996–7004.
69. Kim H-J, Roux A, Sonenshein AL. 2002. Direct and indirect roles of *CcpA* in regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *Mol Microbiol* 45:179–190.
70. Jankovic I, Egeter O, Brückner R. 2001. Analysis of catabolite control protein A-dependent repression in *Staphylococcus xylosus* by a genomic reporter gene system. *J Bacteriol* 183:580–6.

71. Seidl K, Stucki M, Ruegg M, Goerke C, Wolz C, Harris L, Berger-Bächi B, Bischoff M. 2006. *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1183–94.
72. Seidl K, Müller S, François P, Kriebitzsch C, Schrenzel J, Engelmann S, Bischoff M, Berger-Bächi B. 2009. Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 9:95.
73. Fugère A, Lalonde Séguin D, Mitchell G, Déziel E, Dekimpe V, Cantin AM, Frost E, Malouin F. 2014. Interspecific Small Molecule Interactions between Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from Adult Cystic Fibrosis Patients. *PLoS One* 9:e86705.
74. Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F. 2004. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41:35–41.
75. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement.
76. Rodrigue S, Materna AC, Timberlake SC, Blackburn MC, Malmstrom RR, Alm EJ, Chisholm SW. 2010. Unlocking short read sequencing for metagenomics. *PLoS One* 5:e11840.
77. Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M. 2009. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics* 25:1968–1969.
78. Otto TD, Dillon GP, Degraeve WS, Berriman M. 2011. RATT: Rapid Annotation Transfer Tool. *Nucleic Acids Res* 39:e57–e57.

79. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. 2004. Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:6076–6085.
80. Löfblom J, Kronqvist N, Uhlén M, Ståhl S, Wernérus H. 2007. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. *J Appl Microbiol* 102:736–747.
81. Patrick JE, Kearns DB. 2008. MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 70:1166–1179.
82. Harwood CR, Cutting SM. 1990. Molecular biological methods for *Bacillus*. Wiley, Chichester; New York.

2.2.9 SUPPLEMENTAL MATERIAL

```

NewbouldΔhemB      121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNGKDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
P07intR-1,-2,-3    121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
P11intR-1,-2,-3    121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
P20intR-1,-2,-3    121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR1-1,-2,-3       121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR2-1,-2,-3       121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR3-1,-2,-3       121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR4-1,-2,-3       121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR5-1,-2,-3       121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNGKDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR6-1,-2,-3       121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNGKDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
                    *****

```

Figure S1. Amino acid sequence alignments of the catabolite control protein A (*ccpA*) for *S. aureus* SCV resistant mutants selected after serial passage in presence of TO or FC04-100 compared to the parental SCV NewbouldΔ*hemB*.

The mutation position is indicated by the absence of a star. The modified amino acid is highlighted.

```

NewbouldΔHemB      MNLI AAAA IAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
P07intR-1,-2,-3    MNLI AAAA IAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
P11intR-1,-2,-3    MNLI AAAA IAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
P20intR-1,-2,-3    MNLI AAAA IAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR1-1,-2,-3       MNLI AAAA IAIGLSALGSGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR2-1,-2,-3       MNLI AAAA IAIGLSALGAGIGNGLIVRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR3-1,-2,-3       MNLI AAAA IAIGLSALGAGIGNGLIVRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR4-1,-2,-3       MNLI AAAA IAIGLSALGAGIGNGLIVRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR5-1,-2,-3       MNLI AAAA IAIGLSALGACIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR6-1,-2,-3       MNLI AAAA IAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARGQLMGIMIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
                    *****

```

Figure S2. Amino acid sequence alignments of the ATP synthase subunit C for *S. aureus* SCV resistant mutants selected after serial passage in the presence of TO or FC04-100 compared to the parental SCV NewbouldΔ*hemB*.

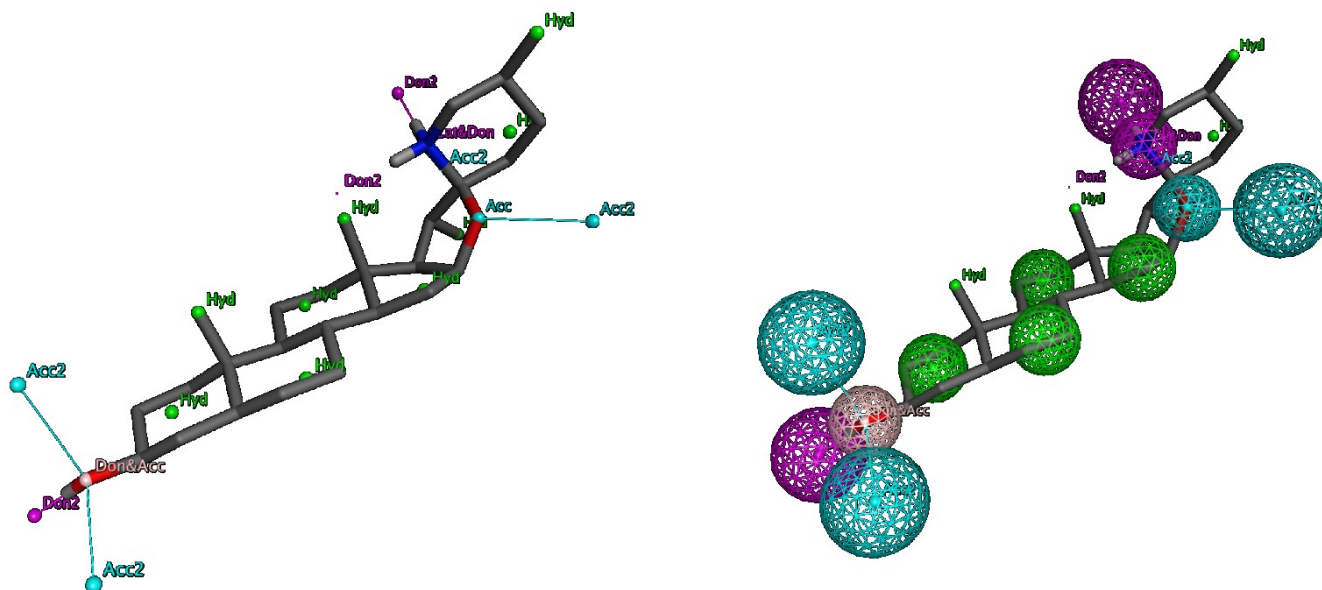
The mutation positions are indicated by the absence of a star. The modified amino acids are highlighted.

CHAPITRE 3

OBTENTION D'UN ANALOGUE NON-STÉROÏDIEN DE LA TOMATIDINE

Les molécules avec lesquelles j'ai effectué mes travaux de maîtrise ont été choisis par l'équipe du Professeur Éric Marsault avec un but bien précis, pouvoir modifier facilement leur structure. Pour les chimistes, une molécule stéroïdienne comme la tomatidine ou FC04-100 offre peu de possibilités (seulement le groupement hydroxyle en position 3) pour faire des modifications sur la molécule. L'analogue FC04-100 a été découvert lors d'une étude précédente (Chagnon *et al.*, 2014), dans laquelle l'équipe Malouin-Marsault a étudié la relation structure activité (SAR) de la tomatidine en synthétisant plusieurs analogues de la tomatidine.

Cette fois-ci, cette équipe a décidé d'utiliser la modélisation moléculaire, en utilisant le logiciel Molecular Operating Environment (MOE), pour tenter de simplifier la molécule, tout en gardant les groupements fonctionnels dans la même conformation 3D. Grâce à ce logiciel, ils ont pu créer une représentation des groupements fonctionnels en 3D, ce qu'on appelle le modèle pharmacophorique de la molécule (**Figure 1**). Une fois ce modèle pharmacophorique déterminé, ils ont pu cribler le modèle sur des millions de molécules dans la banque de données ZINC afin de tenter de trouver une structure qui respectait l'orientation des groupements fonctionnels. La banque contient environ 14 millions de molécules et après avoir criblé le modèle pharmacophorique de la tomatidine contre la banque de données, ils ont obtenu 1412 composés prometteurs qui respectaient le modèle. De ces composés, 127 ont été sélectionnés pour leur diversité structurale et finalement 66 composés ont été achetés, principalement pour des raisons de disponibilité et de prix.



La figure provient de Pierre-Luc Boudreault de l'équipe du professeur Marsault (Université de Sherbrooke)

Figure 1. Structure et modèle pharmacophorique de la tomatidine.

L'idée est de trouver par "superposition moléculaire" des molécules non-stéroïdiennes ayant les mêmes groupes fonctionnels aux mêmes positions.

3.1. Concentration minimale inhibitrice

3.1.1. Méthode

Afin de vérifier si les nouveaux composés non stéroïdiens possédaient une activité antibiotique, des tests de concentration minimale inhibitrice (CMI) ont été effectués. La CMI des composés a été déterminée par la technique de microdilution en plaque de 96

puits en suivant les recommandations du (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2013), excepté que la période d'incubation a été prolongée jusqu'à 48h lorsqu'ils s'agissaient de souches SCV (Mitchell *et al.*, 2010). Généralement, le panel de souches testées était *E. coli* MC4100, *E. coli* 4213 (mutant hyperperméable), *E. coli* *acrAB* (mutant dans une pompe à efflux), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27553, *S. aureus* ATCC 29740 (Newbould) et *S. aureus* ATCC 29740 Δ *hemB* (Newbould Δ *hemB*).

3.1.2. Résultats

Dans le cas du premier criblage des molécules non stéroïdiennes, nous avons testés seulement *S. aureus* Newbould, *S. aureus* Newbould Δ *hemB*, *E. coli* MC4100 ainsi que *E. coli* *acrAB* (mutant dans une pompe à efflux). Le but était simplement de voir si les nouvelles molécules sélectionnées *in silico* possédaient une activité antibiotique.

J'ai testé 66 composés non stéroïdiens pour leur activité inhibitrice contre les souches mentionnées ci-dessus. Les souches de *S. aureus* ont été choisis car nous voulions conserver l'activité que nous avons déjà avant avec la tomatidine. En ajoutant le prototype de *S. aureus*, cela nous permettait de regarder si les nouvelles molécules possédaient aussi un effet contre ce phénotype (comme FC04-100). Les souches de *E. coli* ont été ajoutées afin de savoir si les composés conservaient leur spécificité au *Bacillales*. Pour la grande majorité des composés, je n'ai pas trouvé d'activité notable (>128 ug/mL), sauf pour les composés 20555348, 98923988, 65634521 et 12694856 qui possédaient respectivement une CMI de 128 ug/mL, 128 ug/mL, 128 ug/mL et >128 ug/mL contre *S. aureus* prototype et une CMI de 64 ug/mL, 128 ug/mL, 128 ug/mL et 128 ug/mL contre le phénotype SCV de *S. aureus*.

Par contre, la CMI était au moins 4 fois plus élevée que pour FC04-100 contre ses souches (FC04-100 majeur 4 μ g/ml contre *S. aureus* Newbould et 0,06 μ g/ml contre *S. aureus* Newbould Δ *hemB*).

3.2. Inhibition de l'ATP synthétase

3.2.1. Méthode

La méthode utilisée afin de déterminer si nos molécules non-stéroïdiennes inhibent la production d'ATP est la même que dans l'article dans ce mémoire (Lamontagne Boulet *et al.*, 2018), qui est une version inspirée de (Balemans *et al.*, 2012)

3.2.2. Résultats

Suite à l'obtention de certaines molécules (20555348, 98923988, 65634521 et 12694856) au corps non stéroïdien qui possédaient une activité antibactérienne, nous avons décidé de les tester dans le modèle d'inhibition de l'ATP synthétase. L'hypothèse était que puisque leur conformation en 3D était similaire à la tomatidine et FC04-100, certaines des molécules allaient effectivement inhiber la production d'ATP. Parmi les molécules testées, une molécule possédait la capacité d'inhiber la production d'ATP dans le modèle de vésicules de membrane inversées. Comme il est possible de constater dans la **Figure 2**, la molécule 20555348 possède une IC_{50} de $347,7 \pm 54,5$ $\mu\text{g/ml}$. C'est-à-dire, qu'à cette concentration, ce composé est en mesure d'inhiber 50 % de la production de l'ATP dans notre essai. Dans l'essai, l' IC_{50} du poison universel DCCD était similaire aux valeurs retrouvées dans la littérature, utilisé comme contrôle (Haagsma *et al.*, 2009; Balemans *et al.*, 2012). Par la suite, nous avons décidé de tester cette molécule dans un modèle d'inhibition de l'ATP synthétase isolée de mitochondrie, car ultimement, nous souhaitons avoir une molécule spécifique pour les bactéries. Il est possible de constater que même à des concentrations de 1024 $\mu\text{g/ml}$, notre composé non stéroïdien n'est pas en mesure d'inhiber 50 % de la production d'ATP (**Figure 3**). Comme contrôle, nous avons utilisé le DCCD et l'oligomycine et encore une fois, nos valeurs obtenues sont similaires à celles retrouvées dans la littérature (Haagsma *et al.*, 2009; Balemans *et al.*, 2012).

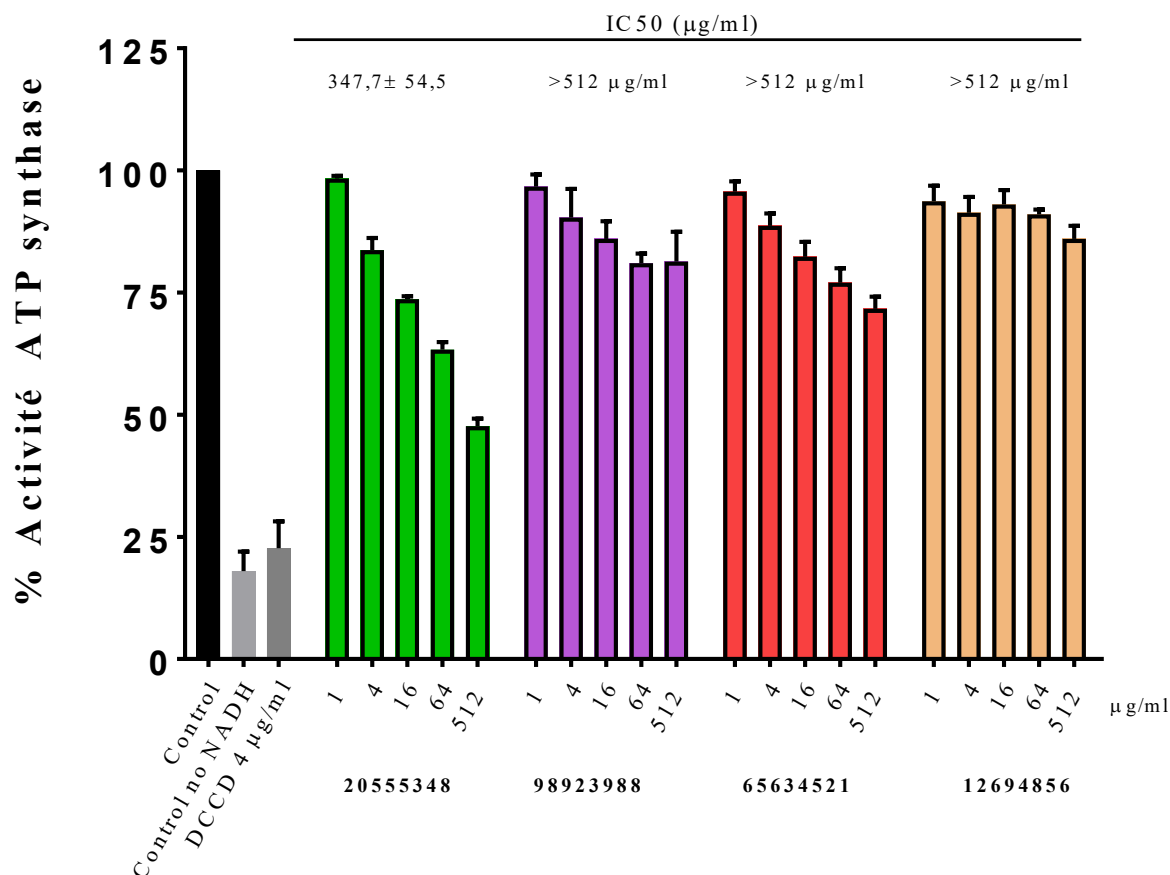


Figure 2. Effet des composés *in silico* sur l'activité de l'ATP synthétase de *S. aureus* Newbould $\Delta hemB$.

Les composés 20555348, 98923988, 65634521 et 12694856 possédaient respectivement une CMI de 64-128 ug/mL, 128 ug/mL, 128 ug/mL et 128 ug/mL contre *S. aureus* Newbould $\Delta hemB$

20555348

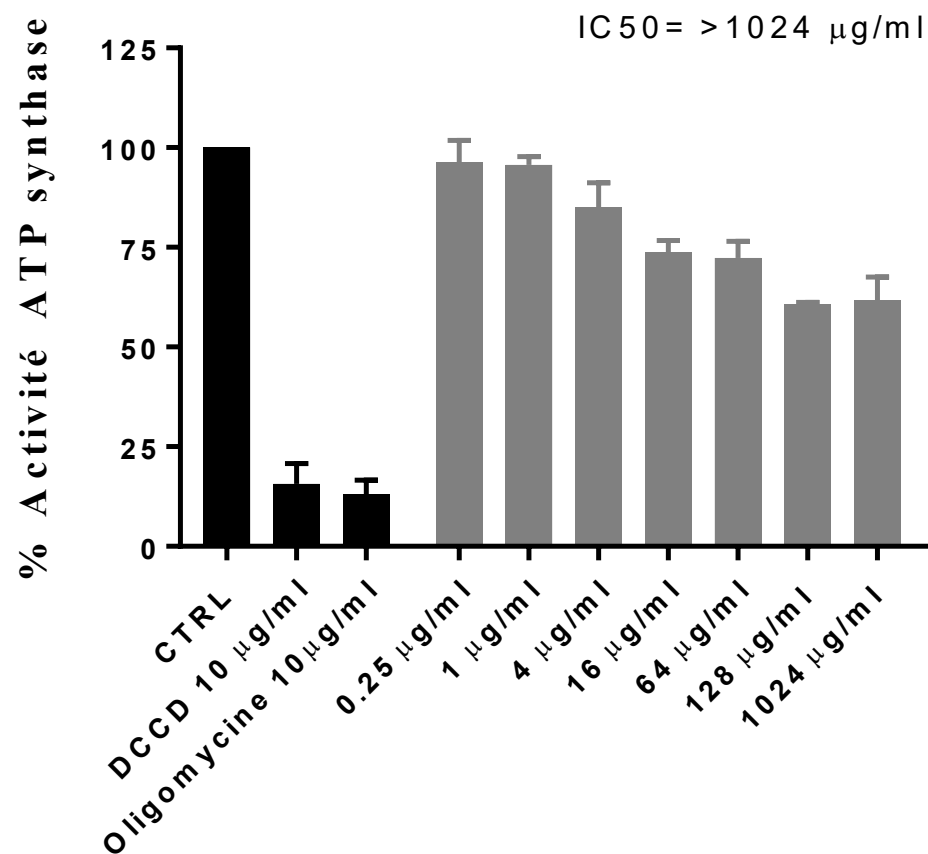


Figure 3. Effet de 20555348 sur l'activité de l'ATP synthétase des mitochondries

3.3. Synergie avec aminoglycosides

3.3.1. Méthode

Afin de déterminer s'il y a synergie entre les nouveaux composés et les aminoglycosides, un protocole de « checkerboard » a été effectué. Il s'agit d'une méthode similaire à la technique de microdilution en plaque 96 puits pour déterminer les CMI, mais où les deux composés à évaluer sont dilués dans des directions contraires pour obtenir un éventail de concentrations et combinaison. Ceci permet d'évaluer le « fractional inhibitory concentration » index. Le FIC index = $FIC_A + FIC_B = A/CMI_A + B/CMI_B$, dans le cas où A et B sont les CMI lorsque les composés testés sont en combinaison, CMI_A et CMI_B sont les CMI des composés lorsque testés seuls et FIC_A et FIC_B sont les FIC calculés des composés A et B (Eliopoulos, George M., 1996). Il y a un effet additif si le FIC index se trouve entre 0.5-4, il y a synergie si le FIC index est < 0.5 et il y a un effet antagoniste si le FIC index est > 4 (Odds, 2003).

3.3.2. Résultats

Afin de confirmer si notre composé non stéroïdien possédait toutes les mêmes caractéristiques que la tomatidine et FC04-100 (activité antibactérienne contre *S. aureus*, inhibition de l'ATP synthétase bactérienne de *S. aureus*), nous avons aussi effectué un essai pour observer si cette molécule avait elle aussi un effet synergique avec les aminoglycosides contre les souches de *S. aureus* prototype. Avec la méthode du « checkerboard », nous avons été en mesure de démontrer que cette molécule possède, elle aussi, une activité synergique avec les aminoglycosides contre la souche de *S. aureus* Newbould. Effectivement, le FIC index calculé était inférieure à 0,5 (Tableau 1).

Tableau 1. Synergie de 20555348 avec les aminoglycosides contre la souche prototype *S. aureus* Newbould

	CMI seule	CMI avec 16 µg/ml de 2055	FIC _A
Gentamicine	0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	0,24
	CMI seule	CMI + 0,25 µg/ml de gentamicine	FIC _B
20555348	128 µg/ml	16 µg/ml	0,125
			FIC index
FIC index=	FIC _A +FIC _B =	0,24+0,125=	0,365

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

4.1. Preuve biochimique

Comme mentionné dans mon introduction, mon objectif principal de ma maîtrise était de démontrer la cible de la tomatidine à l'aide d'un essai biochimique. Notre hypothèse de départ était que la tomatidine devait lier l'ATP synthétase, puisque lors d'une étude de mutagenèse fait auparavant, les mutants ayant des hauts niveaux de résistance possédaient tous des mutations dans le gène *atpE* qui code pour la sous-unité c de l'ATP synthétase. Je devais donc mettre au point un essai biochimique permettant de confirmer que la tomatidine interférait avec l'ATP synthétase.

Grâce au test biochimique de l'inhibition de l'ATP synthétase sur des vésicules de membranes inversées, il a été possible de déterminer le mode d'action de la tomatidine ainsi que de ses dérivés, soit une molécule qui est capable d'inhiber la production d'ATP chez les *Bacillales*. La technique utilisée est décrite dans l'étude (Balemans *et al.*, 2012). Elle consiste à obtenir des vésicules de membranes inversées par lyse mécanique de la membrane grâce à la press de French. Avec cette méthode, il est possible de travailler seulement avec les protéines membranaires sans avoir tous les autres mécanismes de la bactérie. L'ATP synthétase est un enzyme qui utilise l'énergie générée par le $\Delta\mu H$ afin de synthétiser de l'ATP (Capaldi and Aggeler, 2002). Par contre, bien que cette enzyme soit omniprésente chez presque tous les êtres vivants et elle est très différente selon les espèces (von Ballmoos, Cook and Dimroth, 2008; von Ballmoos, Wiedenmann and Dimroth, 2009). Comme mentionné dans l'introduction (chapitre 1), il y a peu de littérature sur l'ATP synthétase de *S. aureus*, par contre, il est connu que cette enzyme est importante pour la croissance et la survie (Ko *et al.*, 2006; Balemans *et al.*, 2012). De plus, la sous-unité c de l'ATP synthétase

bactérienne est une cible cliniquement validée depuis l'approbation du nouvel antibiotique bédaquiline pour traiter la tuberculose, qui cible justement la sous-unité c de *Mycobacterium tuberculosis* (Andries *et al.*, 2005; Cohen, 2013). Il a été proposé dans l'étude de (Hards *et al.*, 2015) que la bédaquiline se lierait à la sous-unité c et cela perturberait l'interface entre la sous-unité a et c. Cette perturbation entraînerait un cycle de protons futile et inhiberait la production d'ATP par l'ATP synthétase.

De plus, il a été possible de démontrer une corrélation entre l'affinité de nos molécules, c'est-à-dire leur IC50 respectif et leur CMI. Effectivement, comme démontrée dans la **figure 4C** du chapitre 2, il est possible de constater qu'il existe une corrélation entre la structure et l'activité de la molécule sur l'ATP synthétase et que le fait de posséder un squelette stéroïdien n'est pas suffisant pour inhiber la synthèse de l'ATP. De plus, cet essai biochimique a confirmé que l'orientation du groupe fonctionnel en position 3 sur la tomatidine ou FC04-100 est important pour l'inhibition de l'ATP synthétase.

Finalement, l'existence d'un mécanisme différent ou d'une cible secondaire est une hypothèse souvent amenée par les évaluateurs d'articles ou la communauté scientifique pour expliquer la différence du spectre d'activité entre la tomatidine et FC04-100. Par contre, lors d'expériences sur les propriétés de la surface des bactéries de *S. aureus* (expérience menée par Jean-Philippe Langlois), il a été possible de détecter une différence majeure entre le phénotype prototype et le phénotype SCV au niveau de l'hydrophobicité de la membrane cellulaire. Effectivement, le phénotype SCV s'est démontré à être beaucoup plus hydrophobe que le phénotype prototype. Cette différence pourrait expliquer pourquoi la tomatidine (plus hydrophobe que FC04-100) possède une activité contre le phénotype SCV. De surcroît, le fait que FC04-100 soit plus hydrophile pour expliquer pourquoi cette molécule est en mesure de cibler le phénotype prototype. Lorsque l'on tient compte de ces résultats, des corrélations entre l'inhibition de l'ATP synthétase, de l'affinité des molécules inhibitrices ainsi que de la preuve génétique (voir **CHAPITRE 2**), il ne fait aucun doute que la cible est bien l'ATP synthétase.

4.2. Nouvelles molécules non stéroïdiennes

La molécule non stéroïdienne 20555348 est une molécule très simple au niveau structural et il est facile de modifier sa structure afin d'avoir de nombreux analogues. Malgré le fait que son activité n'est pas à la hauteur de la tomatidine ou de FC04-100, il est quand même très impressionnant que nous ayons obtenu un composé qui avait les mêmes caractéristiques que nos molécules de départ. Effectivement, il est possible de constater que 20555348 est aussi capable d'inhiber la production de l'ATP et agit aussi en synergie avec les aminoglycosides contre les souches prototype de *S. aureus*. Le fait que la molécule possède les mêmes caractéristiques suggère fortement qu'elle possède le même mode d'action que la tomatidine ou FC04-100. Par la suite, une vingtaine de dérivés de 20555348 ont été testés afin d'essayer d'améliorer leur activité contre les *Bacillales*. La grande majorité des composés n'avait pas d'activité antimicrobienne, par contre deux molécules avaient des CMI's égales ou supérieures à 20555348 contre *S. aureus* Newbould $\Delta hemB$. De plus, il est intéressant de constater que les modifications apportées à la structure de la molécule 65731850 ont élargi le spectre d'activité de cette molécule, cible maintenant des bactéries à l'extérieure de l'ordre des *Bacillales*. Par contre, dans notre cas, cela sous-entend probablement que cette molécule possède possiblement des cibles secondaires retrouvées chez les plusieurs espèces bactériennes ou qu'elle cible uniquement l'ATP synthétase, mais moins spécifiquement, c'est-à-dire dans des régions moins spécifiques aux *Bacillales*. Nous allons donc continuer de modifier la structure de la molécule 20555348, avec l'aide de l'équipe du professeur Éric Marsault et tenter de l'optimiser et d'améliorer son activité antimicrobienne.

Finalement, la tomatidine ainsi que ses dérivés pourraient avoir des applications cliniques très intéressantes. Effectivement, des résultats préliminaires montrent que la tomatidine ainsi que son analogue FC04-100 sont en mesure de diminuer le compte bactérien dans des poumons de souris lors d'une infection pulmonaire à *S. aureus*. De plus, le fait que ces composés ciblent le phénotype SCV, qui est souvent associé à des

infections chroniques et qu'ils sont aussi en mesure de cibler les souches prototypes, lorsqu'utilisés en combinaison avec des aminoglycosides, pourrait faire de ces deux molécules des candidats de choix pour traiter des infections chroniques. Par exemple, il est connu que les poumons des patients atteints de FK sont souvent colonisés à la fois par *S. aureus* SCV, *S. aureus* prototype ainsi que *P. aeruginosa*. Étant donné que les patients FK sont souvent déjà traités avec de la tobramycine inhalée pour contrôler les infections à *P. aeruginosa*, une combinaison avec la tomatidine ou FC04-100 pourrait permettre de traiter les deux phénotypes de *S. aureus* en plus de *P. aeruginosa*.

4.3 Conclusions et perspectives

En conclusion, mon projet de maîtrise a permis de confirmer, de façon biochimique la cible biologique de la tomatidine ainsi que ces dérivés chez *S. aureus*. Nous avons réussi à bâtir un essai reproductible et fiable qui permet de mesurer le pourcentage d'inhibition de la production d'ATP. De plus, nous savons maintenant que l'inhibition est due à une interaction spécifique entre l'ATP synthétase et nos molécules et non due à une interaction non spécifique du corps stéroïdien de nos composés. Nous savons aussi dorénavant que nos molécules ne semblent pas cibler la production d'ATP par les mitochondries, du moins, nos molécules sont beaucoup plus spécifiques pour les ATP synthétases bactériennes que mitochondriales.

De surcroît, nous avons maintenant une nouvelle molécule, 20555348, qui possède les mêmes caractéristiques que la tomatidine et que FC04-100, grâce à notre collaboration avec l'équipe de professeur Éric Marsault. Il sera intéressant de poursuivre avec cette molécule qui a un squelette complètement différent d'un stérol. Dans un avenir rapproché, l'équipe Malouin-Marsault travaille avec un collaborateur afin d'obtenir un cristal de l'ATP synthétase en présence de la tomatidine et d'autres analogues. Avec ce cristal, nous pourrions mieux comprendre la façon dont la tomatidine se lie au niveau moléculaire et où elle se lie. Ces informations nous permettront par la suite de diriger la synthèse de nouveaux composés qui auront une meilleure activité contre l'ATP synthétase.

De plus, il sera intéressant de comprendre davantage la synergie de la tomatidine avec les aminoglycosides contre les souches de types souches. En apprendre davantage sur le type d'interaction entre ses deux composés qui permet cette synergie. Il sera intéressant afin de mieux comprendre la synergie d'étudier les paramètres tel le gradient de protons, le potentiel de membrane ou la force proton motrice en présence des deux composés.

BIBLIOGRAPHIE

Abrahams, J. P. *et al.* (1994) 'Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria', *Nature*. Nature Publishing Group, 370(6491), pp. 621–628. doi: 10.1038/370621a0.

Andries, K. *et al.* (2005) 'A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*.', *Science*, 307(5707), pp. 223–7. doi: 10.1126/science.1106753.

Antonini, E. *et al.* (1971) 'The interaction of cyanide with cytochrome oxidase.', *European journal of biochemistry*, 23(2), pp. 396–400.

Baldan, R. *et al.* (2014) 'Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis airways influences virulence of *Staphylococcus aureus* in vitro and murine models of co-infection.', *PloS one*. Public Library of Science, 9(3), p. e89614. doi: 10.1371/journal.pone.0089614.

Balemans, W. *et al.* (2012) 'Novel antibiotics targeting respiratory ATP synthesis in gram-positive pathogenic bacteria', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), pp. 4131–4139. doi: 10.1128/AAC.00273-12.

von Ballmoos, C., Cook, G. M. and Dimroth, P. (2008) 'Unique rotary ATP synthase and its biological diversity.', *Annual review of biophysics*, 37, pp. 43–64. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.130018.

von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. and Dimroth, P. (2009) 'Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases.', *Annual review of biochemistry*, 78, pp. 649–72. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.104803.

Balwit, J. M. *et al.* (1994) 'Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells.', *The Journal of infectious diseases*, 170(4), pp. 1033–7.

Bates, D. M. *et al.* (2003) '*Staphylococcus aureus* *menD* and *hemB* Mutants Are as Infective as the Parent Strains, but the Menadione Biosynthetic Mutant Persists within the Kidney', *The Journal of Infectious Diseases*, 187(10), pp. 1654–1661. doi: 10.1086/374642.

Besier, S. *et al.* (2007) 'Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease.', *Journal of clinical microbiology*, 45(1), pp. 168–72. doi: 10.1128/JCM.01510-06.

Borisov, V. B. *et al.* (2011) 'The cytochrome bd respiratory oxygen reductases', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(11), pp. 1398–1413. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.06.016.

Boulanger, S. *et al.* (2015) 'Bactericidal effect of tomatidine-tobramycin combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced by interspecific small-molecule interactions', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 59(12), pp. 7458–7464. doi: 10.1128/AAC.01711-15.

Boyer, P. D. (1997) 'THE ATP SYNTHASE—A SPLENDID MOLECULAR MACHINE', *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), pp. 717–749. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717.

Bryan, L. E. and Kwan, S. (1981) 'Aminoglycoside-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in cytochrome d, nitrite reductase, and aerobic transport.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 19(6), pp. 958–64.

Bulger, R. J. (1967) 'A methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Clinical and laboratory experience.', *Annals of internal medicine*, 67(1), pp. 81–9. doi: 10.7326/0003-4819-67-1-81.

Capaldi, R. A. and Aggeler, R. (2002) 'Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor.', *Trends in biochemical sciences*, 27(3), pp. 154–60.

Cárdenas, P. D. *et al.* (2015) 'The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in *Solanaceae* steroidal alkaloid metabolism', *Phytochemistry*, 113, pp. 24–32. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.12.010.

Centers for Disease Control and Prevention. (2013) *Current Antibiotic Resistance Threats in the United States*. Atlanta, GA.

Chagnon, F. *et al.* (2014) 'Unraveling the structure–activity relationship of tomatidine, a steroid alkaloid with unique antibiotic properties against persistent forms of *Staphylococcus aureus*', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 80, pp. 605–620. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.11.019.

Chatterjee, I. *et al.* (2008) 'In Vivo Mutations of Thymidylate Synthase (Encoded by *thyA*) Are Responsible for Thymidine Dependency in Clinical Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*', *Journal of Bacteriology*, 190(3), pp. 834–842. doi: 10.1128/JB.00912-07.

Chiu, F.-L. and Lin, J.-K. (2008) 'Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF-kappaB and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages.', *FEBS letters*, 582(16), pp. 2407–12. doi: 10.1016/j.febslet.2008.05.049.

Clements, M. O. *et al.* (1999) 'CtaA of *Staphylococcus aureus* is required for starvation survival, recovery, and cytochrome biosynthesis.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 181(2), pp. 501–7.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*.

Cohen, J. (2013) 'Infectious disease. Approval of novel TB drug celebrated--with restraint.', *Science*, 339(6116), p. 130. doi: 10.1126/science.339.6116.130.

Collins, M. D. and Jones, D. (1981) 'Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication.', *Microbiological reviews*. American Society

for Microbiology (ASM), 45(2), pp. 316–54.

Colwell, C. A. (1946) 'Small Colony Variants of *Escherichia coli*.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 52(4), pp. 417–22.

Cook, G. M. *et al.* (2014) 'Energetics of Respiration and Oxidative Phosphorylation in Mycobacteria.', *Microbiology spectrum*. NIH Public Access, 2(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0015-2013.

Davies, J. and Davies, D. (2010) 'Origins and evolution of antibiotic resistance.', *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74(3), pp. 417–33. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.

Deckers-Hebestreit, G. and Altendorf, K. (1996) 'The F_0F_1 -type atp synthases of bacteria: structure and function of the F_0 complex', *Annual Review of Microbiology*, 50(1), pp. 791–824. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.791.

Diez, M. *et al.* (2004) 'Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F_0F_1 -ATP synthase', *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(2), pp. 135–141. doi: 10.1038/nsmb718.

Dimroth, P. and von Ballmoos, C. (2007) 'ATP Synthesis by Decarboxylation Phosphorylation', in *Results and problems in cell differentiation*, pp. 153–184. doi: 10.1007/400_2007_045.

Dorsaz, S. *et al.* (2017) 'Identification and mode of action of a plant natural product targeting human fungal pathogens', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. AAC.00829-17. doi: 10.1128/AAC.00829-17.

Duncan, T. M. *et al.* (1995) 'Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli* F_1 -ATPase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 92(24), pp. 10964–10968. doi: 10.1073/pnas.92.24.10964.

von Eiff, C. *et al.* (1997) 'A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly.', *Journal of bacteriology*, 179(15), pp.

4706–12.

von Eiff, C., Peters, G. and Becker, K. (2006) 'The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections.', *Injury*, 37 Suppl 2(2), pp. S26-33. doi: 10.1016/j.injury.2006.04.006.

Eliopoulos, George M., and R. C. M. (1996) 'Antimicrobial combinations', *Antibiotics in laboratory medicine* 4, pp. 330–396.

Fang, E. F. *et al.* (2017) 'Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/Nrf2 pathway', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 7, p. 46208. doi: 10.1038/srep46208.

Farrell, P. M. (2008) 'The prevalence of cystic fibrosis in the European Union', *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(5), pp. 450–453. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.007.

Feniouk, B. A., Suzuki, T. and Yoshida, M. (2006) 'The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of FOF1-ATP synthase', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Elsevier, 1757(5–6), pp. 326–338. doi: 10.1016/J.BBABIO.2006.03.022.

Fillingame, R. H., Angevine, C. M. and Dmitriev, O. Y. (2003) 'Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase', in *FEBS Letters*, pp. 29–34. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01101-3.

Fischer, S., Gräber, P. and Turina, P. (2000) 'The activity of the ATP synthase from *Escherichia coli* is regulated by the transmembrane proton motive force', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 275(39), pp. 30157–30162. doi: 10.1074/jbc.275.39.30157.

García-Fernández, E. *et al.* (2017) 'Membrane Microdomain Disassembly Inhibits MRSA Antibiotic Resistance.', *Cell*. Elsevier, 0(0). doi: 10.1016/j.cell.2017.10.012.

Gause, E. M., Buck, M. A. and Douglas, M. G. (1981) 'Binding of citreoviridin to the beta subunit of the yeast F1-ATPase.', *The Journal of biological chemistry*, 256(2), pp.

557–9.

Giedraitienė, A. *et al.* (2011) 'Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria.', *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), pp. 137–46.

Gilligan, P. H. *et al.* (1987) 'Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis.', *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 25(7), pp. 1258–61.

González-Lamothe, R. *et al.* (2009) 'Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens.', *International journal of molecular sciences*. Molecular Diversity Preservation International, 10(8), pp. 3400–19. doi: 10.3390/ijms10083400.

Götz, F., Bannerman, T. and Schleifer, K.-H. (2006) 'The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*', in *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer US, pp. 5–75. doi: 10.1007/0-387-30744-3_1.

Götz, F. and Mayer, S. (2013) 'Both terminal oxidases contribute to fitness and virulence during organ-specific *Staphylococcus aureus* colonization.', *mBio*. American Society for Microbiology, 4(6), pp. e00976-13. doi: 10.1128/mBio.00976-13.

Grundlingh, J. *et al.* (2011) '2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death.', *Journal of medical toxicology: official journal of the American College of Medical Toxicology*. Springer, 7(3), pp. 205–12. doi: 10.1007/s13181-011-0162-6.

Guay, I. *et al.* (2018) 'Tomatidine and analog FC04-100 possess bactericidal activities against *Listeria*, *Bacillus* and *Staphylococcus spp*', *BMC Pharmacology and Toxicology*. BioMed Central, 19(1), p. 7. doi: 10.1186/s40360-018-0197-2.

Haagsma, A. C. *et al.* (2009) 'Selectivity of TMC207 towards mycobacterial ATP synthase compared with that towards the eukaryotic homologue.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 53(3), pp. 1290–2. doi: 10.1128/AAC.01393-08.

Haagsma, A. C. *et al.* (2010) 'ATP synthase in slow- and fast-growing mycobacteria is active in ATP synthesis and blocked in ATP hydrolysis direction', *FEMS Microbiology Letters*. Wiley/Blackwell (10.1111), 313(1), pp. 68–74. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02123.x.

Hammer, N. D. *et al.* (2013) 'Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host.', *mBio*. American Society for Microbiology, 4(4), pp. e00241-13. doi: 10.1128/mBio.00241-13.

Hards, K. *et al.* (2015) 'Bactericidal mode of action of bedaquiline', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 70(7), pp. 2028–2037. doi: 10.1093/jac/dkv054.

Häussler, S. *et al.* (2003) 'Fatal outcome of lung transplantation in cystic fibrosis patients due to small-colony variants of the *Burkholderia cepacia* complex.', *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 22(4), pp. 249–53. doi: 10.1007/s10096-003-0901-y.

Hermolin, J. and Fillingame, R. H. (1989) 'H⁺-ATPase activity of *Escherichia coli* F1F0 is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit c) of the F0 complex.', *The Journal of biological chemistry*, 264(7), pp. 3896–903.

HEYTLER, P. G. and PRICHARD, W. W. (1962) 'A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones.', *Biochemical and biophysical research communications*, 7, pp. 272–5.

Hirose, S., Yaginuma, N. and Inada, Y. (1974) 'Disruption of charge separation followed by that of the proton gradient in the mitochondrial membrane by CCCP.', *Journal of biochemistry*, 76(1), pp. 213–6.

Hong, S. and Pedersen, P. L. (2008) 'ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas.', *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 72(4), p. 590–641, Table of Contents. doi:

10.1128/MMBR.00016-08.

Jensen, J. (1956) 'Biosynthesis of Hematin Compounds in a Hemin Requiring Strain of *Micrococcus Pyogenes* var. *aureus*', *Journal of bacteriology*, 73(3), pp. 324–333.

Jensen, P. R. and Michelsen, O. (1992) 'Carbon and energy metabolism of atp mutants of *Escherichia coli*.', *Journal of bacteriology*, 174(23), pp. 7635–41.

Jiang, W. *et al.* (2001) 'The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 98(9), pp. 4966–71. doi: 10.1073/pnas.081424898.

Johnson, K. M. *et al.* (2009) 'Mechanistic basis for differential inhibition of the F_1F_0 -ATPase by aurovertin', *Biopolymers*, 91(10), pp. 830–840. doi: 10.1002/bip.21262.

Jones, M. G. *et al.* (1984) 'A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase.', *The Biochemical journal*. Portland Press Limited, 220(1), pp. 57–66. doi: 10.1042/BJ2200057.

Kahl, B. C. (2014) 'Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*--a bacterial survival strategy.', *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 21, pp. 515–22. doi: 10.1016/j.meegid.2013.05.016.

Kahl, B. C., Becker, K. and Löffler, B. (2016) 'Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections', *Clinical Microbiology Reviews*, 29(2), pp. 401–427. doi: 10.1128/CMR.00069-15.

Kato-Yamada, Y. *et al.* (1999) 'Epsilon subunit, an endogenous inhibitor of bacterial $F(1)$ -ATPase, also inhibits $F(0)F(1)$ -ATPase.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 274(48), pp. 33991–4. doi: 10.1074/JBC.274.48.33991.

- Ko, K. S. *et al.* (2006) 'Screening of Essential Genes in *Staphylococcus aureus* N315 Using Comparative Genomics and Allelic Replacement Mutagenesis', *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Koul, A. *et al.* (2007) 'Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase', *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 3(6), pp. 323–324. doi: 10.1038/nchembio884.
- Kriegeskorte, A. *et al.* (2014) '*Staphylococcus aureus* small colony variants show common metabolic features in central metabolism irrespective of the underlying auxotrophism', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media SA, 4, p. 141. doi: 10.3389/fcimb.2014.00141.
- Lamontagne Boulet, M. *et al.* (2018) 'Tomatidine, a lead antibiotic molecule that targets *Staphylococcus aureus* ATP synthase subunit C', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. AAC.02197-17. doi: 10.1128/AAC.02197-17.
- Leavesley, H. B. *et al.* (2008) 'Interaction of Cyanide and Nitric Oxide with Cytochrome c Oxidase: Implications for Acute Cyanide Toxicity', *Toxicological Sciences*, 101(1), pp. 101–111. doi: 10.1093/toxsci/kfm254.
- Linnett, P. E. *et al.* (1978) 'Citroviridin, a specific inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase.', *The Biochemical journal*, 170(3), pp. 503–10.
- Lodish, Harvey. Baltimore, David. Berk, Arnold. Zipursky, S. Matsudaira, Paul. Darnell, J. (1995) *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman.
- McLaughlin, S. (1972) 'The mechanism of action of DNP on phospholipid bilayer membranes', *The Journal of Membrane Biology*. Springer-Verlag, 9(1), pp. 361–372. doi: 10.1007/BF01868062.
- Medina, J. M. *et al.* (2012) 'Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes', *Parasitology*. Cambridge University Press, 139(10), pp. 1253–1265.

doi: 10.1017/S0031182012000522.

Medina, J. M. *et al.* (2015) 'Mechanisms of growth inhibition of *Phytomonas serpens* by the alkaloids tomatine and tomatidine', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Instituto Oswaldo Cruz, 110(1), pp. 48–55. doi: 10.1590/0074-02760140097.

Mellwig, C. and Böttcher, B. (2003) 'A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(20), pp. 18544–9. doi: 10.1074/jbc.M212852200.

Menz, R. I., Walker, J. E. and Leslie, A. G. (2001) 'Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis.', *Cell*, 106(3), pp. 331–41.

von Meyenburg, K. *et al.* (1982) 'Promoters of the *atp* operon coding for the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* mapped by Tn10 insertion mutations.', *Molecular & general genetics : MGG*, 188(2), pp. 240–8.

Miller, M. H. *et al.* (1980) 'Gentamicin uptake in wild-type and aminoglycoside-resistant small-colony mutants of *Staphylococcus aureus*.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 18(5), pp. 722–9.

Mitchell, G. *et al.* (2008) '*Staphylococcus aureus* SigB activity promotes a strong fibronectin-bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients', *Molecular Microbiology*, 70(6), pp. 1540–1555. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06511.x.

Mitchell, G., Brouillette, E., *et al.* (2010) 'A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides.', *Microbial pathogenesis*, 48(1), pp. 18–27. doi: 10.1016/j.micpath.2009.10.003.

Mitchell, G., Séguin, D. L., *et al.* (2010) '*Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to

Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide.', *BMC microbiology*, 10(1), p. 33. doi: 10.1186/1471-2180-10-33.

Mitchell, G. *et al.* (2011) 'Tomatidine inhibits replication of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis airway epithelial cells.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(5), pp. 1937–45. doi: 10.1128/AAC.01468-10.

Mitchell, G. *et al.* (2012) 'Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), pp. 559–568. doi: 10.1093/jac/dkr510.

Mitchell, G. *et al.* (2013) 'SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in
10.1371/journal.pone.0065018.

Mitchell, P. (1961) 'Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism', *Nature*. Nature Publishing Group, 191(4784), pp. 144–148. doi: 10.1038/191144a0.

Mitome, N. *et al.* (2004) 'Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: Indication of noninteger 10:3 H⁺/ATP ratio and permissive elastic coupling', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), pp. 12159–12164. doi: 10.1073/pnas.0403545101.

Moisan, H. *et al.* (2006) 'Transcription of Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients Is Influenced by SigB', *Journal of Bacteriology*, 188(1), pp. 64–76. doi: 10.1128/JB.188.1.64-76.2006.

Morelli, P. *et al.* (2015) 'Characterization of *Staphylococcus aureus* small colony variant strains isolated from Italian patients attending a regional cystic fibrosis care centre.', *The new microbiologica*, 38(2), pp. 235–43.

Nadanaciva, S., Weber, J. and Senior, A. E. (2000) 'New probes of the F1-ATPase catalytic transition state reveal that two of the three catalytic sites can assume a transition state conformation simultaneously', *Biochemistry*, 39(31), pp. 9583–9590.

doi: 10.1021/bi000941o.

Neill, J. O. ' (2014) 'Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Commissioned by the UK Prime Minister, 2014.'

Nicholls, P. and Soulimane, T. (2004) 'The mixed valence state of the oxidase binuclear centre: how *Thermus thermophilus* cytochrome ba3 differs from classical aa3 in the aerobic steady state and when inhibited by cyanide', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Elsevier, 1655, pp. 381–387. doi: 10.1016/J.BBABIO.2003.06.007.

Odds, F. C. (2003) 'Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), pp. 1–1. doi: 10.1093/jac/dkg301.

Padoa, C. *et al.* (1999) 'Cystic fibrosis carrier frequencies in populations of African origin', *J. Med. Genet.*, 36(1), pp. 41–44. doi: 10.1136/jmg.36.1.41.

Paganin, P. *et al.* (2015) 'Changes in cystic fibrosis airway microbial community associated with a severe decline in lung function.', *PloS one*, 10(4), p. e0124348. doi: 10.1371/journal.pone.0124348.

Pogoryelov, D. *et al.* (2010) 'Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the Fo complex of ATP synthases', *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 6(12), pp. 891–899. doi: 10.1038/nchembio.457.

Poole, R. K. and Cook, G. M. (2000) 'Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation.', *Advances in microbial physiology*, 43, pp. 165–224.

Preiss, L. *et al.* (2015) 'Structure of the mycobacterial ATP synthase Fo rotor ring in complex with the anti-TB drug bedaquiline.', *Science advances*, 1(4), p. e1500106. doi: 10.1126/sciadv.1500106.

Proctor, R. A. *et al.* (2006) 'Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that

facilitates persistent and recurrent infections.’, *Nature reviews. Microbiology*, 4(4), pp. 295–305. doi: 10.1038/nrmicro1384.

Rao, S. P. S. *et al.* (2008) ‘The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), pp. 11945–11950. doi: 10.1073/pnas.0711697105.

Revington, M. *et al.* (1999) ‘The dimerization domain of the b subunit of the *Escherichia coli* F(1)F(0)-ATPase.’, *The Journal of biological chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 274(43), pp. 31094–101. doi: 10.1074/jbc.274.43.31094.

Roddick, J. G. (1979) ‘Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols in vitro’, *Phytochemistry*, 18(9), pp. 1467–1470. doi: 10.1016/S0031-9422(00)98476-0.

Sandrock, R. W. and VanEtten, H. D. (1998) ‘Fungal Sensitivity to and Enzymatic Degradation of the Phytoanticipin α -Tomatine’, *Phytopathology*, 88(2), pp. 137–143. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.2.137.

Santana, M. *et al.* (1994) ‘*Bacillus subtilis* F₀F₁ ATPase: DNA sequence of the atp operon and characterization of atp mutants.’, *Journal of bacteriology*, 176(22), pp. 6802–11.

Satre, M., Bof, M. and Vignais, P. V (1980) ‘Interaction of *Escherichia coli* adenosine triphosphatase with aurovertin and citreoviridin: inhibition and fluorescence studies.’, *Journal of bacteriology*, 142(3), pp. 768–76.

Schägger, H. (2002) ‘Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria’, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier, 1555(1–3), pp. 154–159. doi: 10.1016/S0005-2728(02)00271-2.

Sebald, W., Machleidt, W. and Wachter, E. (1980) ‘N,N’-dicyclohexylcarbodiimide binds

specifically to a single glutamyl residue of the proteolipid subunit of the mitochondrial adenosinetriphosphatases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(2), pp. 785–9.

Seggewiss, J. *et al.* (2006) 'Reporter metabolite analysis of transcriptional profiles of a *Staphylococcus aureus* strain with normal phenotype and its isogenic *hemB* mutant displaying the small-colony-variant phenotype.', *Journal of bacteriology*, 188(22), pp. 7765–77. doi: 10.1128/JB.00774-06.

Sriramulu, D. (2013) 'Evolution and impact of bacterial drug resistance in the context of cystic fibrosis disease and nosocomial settings.', *Microbiology insights*, 6, pp. 29–36. doi: 10.4137/MBI.S10792.

Stock, D., Leslie, A. G. and Walker, J. E. (1999) 'Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase.', *Science*, American Association for the Advancement of Science, 286(5445), pp. 1700–5. doi: 10.1126/SCIENCE.286.5445.1700.

Stryer, L. (1995) *Biochemistry*. W.H. Freeman.

Symersky, J. *et al.* (2012) 'Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 109(35), pp. 13961–5. doi: 10.1073/pnas.1207912109.

Terada, H. (1990) 'Uncouplers of oxidative phosphorylation.', *Environmental health perspectives*. National Institute of Environmental Health Science, 87, pp. 213–8.

Thöny-Meyer, L. (1997) 'Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria.', *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. American Society for Microbiology, 61(3), pp. 337–76.

Toei, M. and Noji, H. (2013) 'Single-molecule analysis of F₀F₁-ATP synthase inhibited by N,N-dicyclohexylcarbodiimide.', *The Journal of biological chemistry*. American

Society for Biochemistry and Molecular Biology, 288(36), pp. 25717–26. doi: 10.1074/jbc.M113.482455.

Tran, S. L. and Cook, G. M. (2005) 'The F₁F_o-ATP Synthase of *Mycobacterium smegmatis* Is Essential for Growth', *Journal of Bacteriology*, 187(14), pp. 5023–5028. doi: 10.1128/JB.187.14.5023-5028.2005.

Tynecka, Z. *et al.* (1999) 'Energy conservation in aerobically grown *Staphylococcus aureus*', *Research in Microbiology*. Elsevier Masson, 150(8), pp. 555–566. doi: 10.1016/S0923-2508(99)00102-3.

Voggu, L. *et al.* (2006) 'Microevolution of Cytochrome bd Oxidase in Staphylococci and Its Implication in Resistance to Respiratory Toxins Released by *Pseudomonas*', *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 188(23), pp. 8079–8086. doi: 10.1128/JB.00858-06.

Walker, J. E. (2013) 'The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown', *Biochemical Society Transactions*, 41(1), pp. 1–16. doi: 10.1042/BST20110773.

Yasuda, R. *et al.* (2001) 'Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase.', *Nature*, 410(6831), pp. 898–904. doi: 10.1038/35073513.

